

**Experimentelle Untersuchungen zur Belastbarkeit
einer maternalen Immunität von Saugmäusen gegen
infektiöse Ektromelie – Ein Beitrag zur
Immunprophylaxe der Krankheit mit Orthopoxviren**

Ruth Barbara Kaufmann

1978

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR BELASTBARKEIT
EINER MATERNALEN IMMUNITÄT VON SAUGMÄUSEN
GEGEN INFEKTIÖSE EKTROMELIE - EIN BEITRAG ZUR
IMMUNPROPHYLAXE DER KRANKHEIT MIT ORTHOPOXVIREN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ruth Barbara Kaufmann

aus

Frankfurt am Main

München 1978



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. E. Munz
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

Tag der Promotion: 28. Juli 1978

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Schrifttum</u>	2
2.1.	Definition der Mäusepockeninfektion	2
2.2.	Klassifizierung und Eigenschaften des Erregers	3
2.3.	Viruszüchtung	5
2.3.1.	- in der Gewebekultur	5
2.3.2.	- im embryonierten Hühnerei	6
2.4.	Epidemiologie	7
2.5.	Pathogenese und klinische Erscheinungen	8
2.6.	Pathologisch-anatomischer Befund	11
2.7.	Diagnosemöglichkeiten	13
2.7.1.	Serologische Verfahren	13
2.7.2.	Klinische Diagnose	14
2.8.	Bekämpfung und Kontrolle	15
2.9.	Immunitätsverhältnisse bei Mäusepocken	16
2.9.1.	Die humorale Immunität	16
2.9.2.	Die zelluläre Immunität	19
2.9.3.	Die passive Immunität	21
2.10.	Die Immunität nach Impfung	24
2.10.1.	Serologische Beziehungen zu anderen Viren des Genus Orthopox	24
2.10.2.	Impfstoffe und -methoden	25
2.10.3.	Zur Problematik der Verwendung von Pockenimpfstoffen in der Versuchstierzucht	29
3.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	32
3.1.	Material und Methoden	32
3.1.1.	Abkürzungen	32
3.1.2.	Medien	33
3.1.3.	Zellkulturen	33
3.1.4.	Virusstämme	35
3.1.4.1.	Impfstämme	35
3.1.4.2.	Challenge-Virus	35

3.1.5.	Viruszüchtung	35
3.1.6.	Virustitrationen	37
3.1.6.1.	KID ₅₀ -Bestimmung	37
3.1.6.2.	EID ₅₀ -Bestimmung	38
3.1.6.3.	LD ₅₀ -Bestimmung	39
3.1.7.	Versuchstiere und Versuchsbedingungen	41
3.1.8.	Immunisierungs- und Infektionsmethoden	42
3.1.9.	Virusnachweis in EV-infizierten Säuglingsmäusen	42
3.1.10.	Serumgewinnung	43
3.1.11.	Hämagglutinations-Hemmungs-Reaktion (HAH-Reaktion)	43
3.1.12.	Versuchsanordnung	44
4.	<u>Ergebnisse</u>	49
4.1.	Titrationen der Ektromelie-Virus- Stämme in adulten Mäusen	49
4.1.1.	Titration des Stammes "Hampstead"	49
4.1.2.	Titration des Stammes "Düsseldorf E 2"	50
4.2.	Titrationen der Ektromelie-Virus- Stämme in infantilen Mäusen	50
4.2.1.	Titration des Stammes "Hampstead"	50
4.2.2.	Titration des Stammes "Düsseldorf E 2"	51
4.3.	Ergebnisse der Vorversuche	52
4.3.1.	Ergebnis des 1. Vorversuchs	52
4.3.2.	Ergebnis des 2. Vorversuchs	54
4.4.	Ergebnis des Hauptversuchs	55
4.5.	Virusnachweis in Säuglingsmäusen	58
4.6.	Hämagglutinations-Hemmungs-Reaktion (HAH-Reaktion)	58
5.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	60
6.	<u>Zusammenfassung</u>	67
7.	<u>Summary</u>	68
8.	Literaturverzeichnis	69

1. Einleitung

Die derzeit gebräuchliche aktive Immunprophylaxe gegen Mäusepocken (Infektiöse Ektromelie) mit vermehrungsfähiges Vaccinia-Virus enthaltenden Impfstoffen ist nicht unbedenklich. Man befürchtet aufgrund des allgemein absinkenden Immunschutzes der Bevölkerung gegen Pocken eine Zunahme von Kontaktinfektionen des Menschen mit diesem Erreger, die besonders für ungeimpfte Personen gefährlich sein können.

Einen Ausweg bietet eventuell der hochattenuierte Vaccinia-Virus-Stamm MVA. Dieses modifizierte und als avirulent geltende Vaccinia-Virus wirkt jedoch schwächer immunogen als das im üblichen Mäusepockenimpfstoff enthaltene; und praktisch einsetzbare Impfstoffe mit abgeschwächtem Ektromelie-Virus als wirksamem Prinzip stehen noch nicht zur Verfügung.

Als eventuell möglicher homologer Impfvirusstamm wird derzeit nur der sogenannte attenuierte Ektromelie-Virus-Stamm "Hampstead" diskutiert. Im Rahmen von Untersuchungen zur Immunprophylaxe gegen die infektiöse Ektromelie sollte die Belastbarkeit einer von weiblichen weißen Mäusen auf ihre Nachkommenschaft übertragenen passiven Immunität nach Vakzinierung mit homologen und heterologen Orthopoxviren geprüft werden. Darüber hinaus wollten wir den jetzigen Attenuierungsgrad des Stammes "Hampstead" ermitteln.

2. Schrifttum

2.1. Definition der Mäusepockeninfektion

Die Mäusepocken (MP) sind eine hochkontagiöse und weit verbreitete Viruskrankheit, die unter natürlichen Bedingungen nur Labor-, Haus- und Wildmäuse befällt.

Vier verschiedene Verlaufsformen werden beobachtet:

- Die akute bzw. perakute Form äußert sich als Septikämie und ist durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet.
- Die chronische Erkrankung gab, da sie mit Verlust der Akren einhergehen kann, den Mäusepocken auch den Namen "Infektiöse Ektromelie" (I.E.).
- Der subklinische (klinisch inapparente) Verlauf ist durch das Fehlen äußerer Krankheitserscheinungen und durch eine immunologische Abwehrreaktion der infizierten Tiere charakterisiert.
- Die latente Infektion kommt am häufigsten vor. Sie führt zur unerkannten Durchseuchung von Mäusebeständen und kann durch Streßfaktoren zur manifesten Form aktiviert werden.

Die I.E. wurde erstmals von MARCHAL (1930) beschrieben, und bald wurde auch ihre Bedeutung erkannt. Sie liegt in den hohen, durch die klinisch apparenten Formen verursachten wirtschaftlichen Verlusten und, was besonders schwerwiegend sein kann, in der Verfälschung von Versuchsergebnissen durch unnormale Reaktionen latent bzw. subklinisch infizierter Labormäuse (RÖHRER, 1967).

2.2. Klassifizierung und Eigenschaften des Erregers

Der Erreger der I.E., das Orthopoxvirus muris, gehört zur Untergruppe Variola/Vaccinia des Genus Orthopoxvirus der Familie Poxviridae (FENNER, 1976).

Mit den übrigen Vertretern dieses Genus hat das Mäusepockenvirus (MPV) viele Gemeinsamkeiten in seiner Morphologie, seinem Vermehrungszyklus und in seinen biologischen und chemischen Eigenschaften. Auch in serologischer und immunologischer Hinsicht zeigt es enge Verwandtschaftsbeziehungen. Im Vergleich zu den anderen Orthopoxviren verfügt das Ektromelie-Virus (EV) jedoch über zwei Besonderheiten:

1. Es kann neben Hühnerythrozyten auch noch Mäuseerythrozyten agglutinieren.
2. Es induziert in der infizierten Zelle die Bildung zweier verschiedener Typen von Einschlußkörperchen, eine Eigenschaft, die sonst nur noch das Kuhpockenvirus besitzt (BAXBY, 1975).

Es handelt sich hierbei um intrazytoplasmatische Einschlußkörperchen des Typs B, die allen Pockenviren gemeinsam sind, und des Typs A, die sog. "MARCHAL'schen Einschlußkörperchen". Diese sind größer als die B-Einschlüsse und lassen sich verschieden stark eosinophil anfärben. Sie sind Aggregate reifer Virionen, nicht der Ort der vorhergehenden Virusreplikation (MAYR et al., 1972).

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen liegt die Größe des MPV bei 170 x 230 nm. Das Virus ist ätherstabil, jedoch chloroformlabil. Es besitzt eine relativ hohe Tenazität gegenüber Austrocknung und läßt sich in tiefgefrorenem Zustand über Jahre konservieren.

Durch UV-Strahlen und Desinfektionsmittel - wie z.B. Chloramin und Formalin - wird es rasch inaktiviert (HERRLICH, 1967; RÖHRER, 1967).

Das MPV ist serologisch einheitlich. Es gibt jedoch MPV-Stämme, die sich in ihren biologischen Eigenschaften - wie z.B. in der Virulenz für die Maus und durch ihren Plaque-Charakter in Zellkulturen - voneinander unterscheiden (BAXBY, 1975).

Für die Differenzierung des MPV von den übrigen Tierpockenviren wurden bisher immer biologische Merkmale herangezogen. Hierfür eignen sich besonders das Wachstum des EV auf der Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis, Art und Ablauf des zytopathischen Effekts (zpE) in der Gewebekultur sowie die Infektion von empfänglichen Versuchstieren (MAYR et al., 1972).

In jüngster Zeit wird auf eine spezielle serologische Differenzierung innerhalb der Variola/Vaccinia-Gruppe aufmerksam gemacht. BAXBY (1977) prüfte das Verhalten von Orthopoxviren gegenüber Antiserum, das von hitzeinaktiviertem Vaccinia-Virus induziert worden war. Dieses Antiserum neutralisiert in unterschiedlichem Ausmaß nur künstlich freigesetzte "intrazelluläre" Orthopoxviren, dagegen nicht natürlich freigesetzte "extrazelluläre" Viren. Es gelang, die untersuchten Orthopox-Spezies im Neutralisationstest in drei Gruppen einzuteilen: Vaccinia-, Variola- und Alastrim-Virus wurden bis zu hohen Verdünnungsstufen neutralisiert (= Gruppe A: 1/3000), Kuhpocken-, Elefantenpocken- und Affenpocken-Virus wurden nur in sehr geringem Umfang, wenn überhaupt, neutralisiert (= Gruppe C: $\leq$ 1/40), während Büffelpocken-, Kamelpocken- und Ektromelie-Virus eine mittlere Gruppe mit niedrigen, jedoch signifikanten

Titern bildeten (= Gruppe B: 1/300). Dieses unterschiedliche Verhalten basiert wahrscheinlich auf quantitativen Unterschieden des hitzestabilen Oberflächenantigens der untersuchten Spezies.

2.3. Viruszüchtung

2.3.1. - in der Gewebekultur

Eine in-Vitro-Vermehrung des EV ist in Zellkulturen der verschiedensten Herkunft möglich. Es eignen sich hierfür sowohl die menschliche Zelllinie He-La (BARSKI et al., 1960) als auch normales und tumorös entartetes Gewebe der erwachsenen Maus (ICHIHASHI et al., 1966 u. 1968; MATSUMOTO, 1958) sowie embryonale Mäusefibroblasten (DIEFENTHAL et al., 1959 u. 1961; HABERMEHL et al., 1962). Eine Züchtung gelang auch in Kulturen von Milz und Hoden des Kaninchens, in Kaninchenkorneaepithelien, in embryonalen Rindermuskelzellen, in Affennierenzellen, in Leber- und Nierenzellen der embryonalen Ratte und in Hühnerembryofibroblastenkulturen (KARASEK et al., 1969). Letztere sind auch für Titrationszwecke mittels der Plaques-Auszählmethode und für die Beobachtung des zeitlichen Ablaufs des zpE besonders geeignet.

Der für das MPV in Einschichtkulturen aus embryonalen Mäusefibroblasten typische zpE ist gekennzeichnet durch das Auftreten vielkerniger Riesenzellen, in deren Zytoplasma die charakteristischen eosinophilen Einschlüßkörperchen liegen. Nach anfänglicher Quellung der Zellen und Verschmelzung zu Riesenzellen erfolgt später eine Verdichtung des Zytoplasmas. Die Kerne werden pyknotisch, und schließlich setzt Lysis des Zellrasens ein, wobei die Einschlüßkörperchen in die Umgebung freigesetzt werden.

Die ersten zytopathischen Veränderungen sind in der Regel ab dem 2. Tag p.i. zu beobachten (DIEFENTHAL und HABERMEHL, 1959).

2.3.2. - im embryonierten Hühnerei

Die CAM des Hühnerbruteis stellt ein hochempfindliches Vermehrungssystem für das EV dar, das sowohl für die Titration als auch für die Differenzierung gegenüber anderen Pockenviren ausgezeichnet geeignet ist (MAYR et al., 1972).

Am 3. Tag p.i., dem Höhepunkt der primären Virusphase, kann man auf der beimpften CAM ca. 13 Tage alter Brut-eier punktförmige kleine, kompakte und leicht erhabene Knötchen erkennen, die keine zentrale Nekrose zeigen und von einem schmalen konzentrischen Trübungshof umgeben sind. Häufig entwickeln sich konfluierende Veränderungen. Diese Herdcharakteristik läßt in der Regel schon makroskopisch auf eine Vermehrung von MPV schließen. Mikroskopisch sieht man eine herdförmige Proliferation und Degeneration der Zellen ektodermalen Ursprungs, im mesenchymalen Gewebe eine geringe Zellinfiltration; Einschlußkörperchen kommen in allen drei Keimblättern vor. Die Gefäße sind erweitert, prall gefüllt und zeigen z.T. Wandveränderungen. Am 4. bis 5. Tag p.i. kommt es zur sichtbaren Generalisation des EV auf der CAM. Der Embryo kann die Infektion überleben. Die Intensität der Generalisation und die Vermehrungstendenz sind in hohem Maße von der Bebrütungstemperatur abhängig. Eine Temperatur zwischen 35 und 37 ° C ist für das EV optimal (HERRLICH und MAYR, 1955).

2.4. Epidemiologie

Für die Morbidität und Mortalität der MP spielen Virulenzschwankungen des Erregers ebenso wie genetische Unterschiede in der Empfänglichkeit von Mäusestämmen eine wichtige Rolle (BRIODY, 1959; FENNER, 1948 a, 1949 c). Die individuelle Empfänglichkeit von Mäusen variiert in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht. Weibliche Tiere sind weniger empfänglich als männliche, infantile Mäuse erkranken leichter als erwachsene (FENNER, 1949 d; HORZINEK und HÖPKEN, 1965 a).

Einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Infektion haben auch Streßfaktoren: Transport, Kastration, experimentelle Infektion, Immunsuppression, Tumorimplantation, Chemikalien usw. Sie können latente Infektionen aktivieren und zum Ausbruch der Seuche mit hoher Mortalität führen (BRIODY, 1959).

Eintrittspforten des MPV sind unter natürlichen Bedingungen vor allem Hautabschürfungen und Bißverletzungen, der Respirationstrakt nach Inhalation von virushaltigem Staub und der Verdauungstrakt nach oraler Aufnahme von infizierten Kadavern, Faeces und infiziertem Trinkwasser (BRIODY, 1959; FENNER, 1947 b; HORZINEK und HÖPKEN, 1965 a). Die Ausscheidung des MPV erfolgt über die Faeces, den Harn, den Speichel, das Konjunktivalsekret und über sezernierende Hautläsionen erkrankter oder latent verseuchter Mäuse (FENNER, 1947 c).

Die enterale Infektion induziert fast immer den klinisch inapparenten Verlauf der MP. Nur nach Aufnahme hoher Virusdosen kommt es zum Ausbruch der Krankheit (GLEDHILL, 1962).

Eine natürliche diaplasentare Übertragung des Erregers, die von einer latenten Infektion der Mäuseembryonen gefolgt ist und die im Gegensatz zur subklinischen Infek-

tion kaum serologisch nachweisbar ist, beschreiben GERMER et al. (1961).

Eine künstliche Infektion mit MP gelingt nach intrakutaner, intraperitonealer, intravenöser, subkutaner, intracerebraler, peroraler und intranasaler Applikation des Virus und durch Kontakt mit infizierten Tieren. Die i.p.-Inokulation führt fast stets zu einem raschen septikämischen Verlauf der I.E. mit Todesfolge (HERRLICH, 1967; RÖHRER, 1967). Sie ist in praxi die beste Methode, die ein sicheres "Angehen" der Infektion garantiert (MUNZ: Pers. Mitteilung).

Auch nach künstlicher i.p.-Infektion trächtiger Mäuseweibchen wird das EV auf die Föten übertragen und ist bereits am 3. Tag p.i. in den fetalen Organen nachweisbar. Am 9. Tag p.i. ist in der Regel der ganze Wurf infiziert; zu diesem Zeitpunkt sind in der mütterlichen Plazenta massenhaft MARCHAL'sche Einschlußkörperchen vorhanden (SCHWANZER et al., 1975).

2.5. Pathogenese und klinische Erscheinungen

Die MP wurden erstmals von FENNER (1948) als eine zyklische, nach typischen Regeln ablaufende Infektionskrankheit charakterisiert.

MP nehmen unter natürlichen Verhältnissen ihren Ausgang von einem sog. primären Infektionsherd bzw. einer Primärläsion in der Haut oder Schleimhaut des oberen Respirations- und Digestionstraktes. In perakuten Fällen ist dieser Primärherd nicht zu sehen, da keine Zeit zur Entwicklung bleibt. Während der ca. 7 Tage dauernden Inkubationszeit kommt es dort zu einer logarithmischen Virusvermehrung. Bereits am 1. Tag p.i. erreicht das Virus von der Eintrittspforte aus den regionären Lymphknoten, in dem es sich intensiv vermehrt und zur Zerstörung der

befallenen Zellen führt. Es wird auf lymphogenem und hämatogenem Wege ausgeschleust und gelangt über diese primäre Virämie in die sog. primär affinen Organe (Leber, Milz), wo es ab dem 3. Tag p.i. nachweisbar ist. Das Virus vermehrt sich dort sehr stark und erreicht Titer bis zu 10^{10} infektiöse Einheiten pro g Gewebe. Bald werden die befallenen Organe nekrotisch, und das Virus wird erneut in die Blutbahn freigesetzt. Über diese sekundäre Virämie manifestiert sich das MPV in der Haut und ruft dort das charakteristische klinische Bild hervor (FENNER, 1948 b).

Die pathogenetische Ereigniskette nach i.v.-Applikation einer hohen Virusdosis stellt MIMS (1959 a) wie folgt dar: Nur ein geringer Teil der injizierten Virusmenge gelangt in die Milz und in andere Gewebe; der weitaus größte Teil wird innerhalb kürzester Zeit von den Randzellen der Leber aufgenommen. Die Infektion der benachbarten Leberzellen erfolgt nur von diesen Randzellen aus. Das Virus breitet sich binnen 2 - 3 Tagen in der ganzen Leber aus. Dann sterben die Tiere plötzlich, bevor klinische Symptome bemerkt werden (MIMS, 1959 b).

Hochvirulente Stämme des EV besitzen die Fähigkeit, sich schneller in Leber und Milz zu vermehren als schwach virulente. Sie bedingen deshalb eine fast 100%ige Letalität (FENNER, 1949 c). Solche perakuten Verlaufsformen betreffen vor allem Säuglingsmäuse und Tiere, die älter als ein Jahr sind. Der Grund hierfür ist in einer noch nicht wirksamen bzw. wieder defizient gewordenen Antikörperproduktion dieser Altersgruppen zu suchen. Acht Wochen alte Tiere besitzen dagegen eine relative Resistenz gegenüber dem EV (FENNER, 1949 d).

Beim chronischen Verlauf der MP treten als hervorstechendste klinische Merkmale die Primärläsion und der sekundäre Hautausschlag auf. Während die Primärläsion bevorzugt in der unbehaarten Haut der Lippen, der Pfoten oder des Schwanzes lokalisiert ist, kann sich der sekundäre Hautausschlag in Abhängigkeit von der Schwere der Infektion über den ganzen Körper ausdehnen (RÖHRER, 1967). Die Läsionen erscheinen zunächst als umschriebene Schwellungen in der Haut, die sich zu einem papulösen Exanthem entwickeln. Dann erfolgt die ulzerative Einschmelzung der Papeln, und die betroffenen Stellen der Epidermis fallen der Nekrose anheim. Sie heilen später unter Schorfbildung ab und hinterlassen tiefe haarlose Narben. Die maximale Infektiosität solcher chronisch kranken Tiere besteht vom 9. bis 12. Tag p.i. (FENNER, 1948 b). Dieser protrahierte Verlauf der MP geht oft mit Konjunktivitis und Blepharitis einher. Er ist durch eine niedrige Mortalität gekennzeichnet. Manchmal kann auch ein sog. "Mumpsgesicht" beobachtet werden, bei dem es sich um eine typische Ödematisierung des Kopfes mit Schwellung der Kopflymphknoten handelt.

Bei erhöhter Resistenz gegenüber dem EV kommt es zu allergischen Reaktionen im Bereich des Primärinfektionsherdes. Diese äußern sich in ödematöser Schwellung und exsudativer Entzündung der Haut der Pfoten, des Schwanzes oder der Lippen, die von ulzerativen Prozessen gefolgt werden. Die veränderten Körperteile sind deutlich vom gesunden Gewebe demarkiert; manchmal kommt es zur Gangränesezierung und Amputation der betroffenen Zehen, Gliedmaße oder des Schwanzes, oft jedoch auch zur Restitutio ad integrum. Solche allergischen Phänomene werden nicht allzu häufig beobachtet (FENNER, 1948 b; RÖHRER, 1967).

2.6. Pathologisch-anatomischer Befund

Analog den verschiedenen Verlaufsformen der I.E. werden z.T. recht unterschiedliche postmortale Veränderungen beobachtet. Während bei perakuten Todesfällen die inneren Organe oft makroskopisch völlig unverändert sein können, fällt nach akutem septikämischem Verlauf besonders die reichliche Exsudatansammlung in Brust- und Bauchhöhle auf; Organveränderungen betreffen besonders stark Leber und Milz.

Die Leber erscheint blaß und gefleckt (TRENTIN, 1953), vergrößert und von schmutzig-grauer Farbe. Ihre Konsistenz ist weich, die Oberfläche feucht und mit weißen Pünktchen übersät. Histologisch finden sich Blutungen und nekrobiotische Herde, die Neigung zum Konfluieren zeigen (RÖHRER, 1967). Postakute Veränderungen bestehen nach GÜTTNER (1974) in multiplen disseminierten, z.T. hyalinisierten Koagulationsnekrosen mit mesenchymaler Reaktion und Entwicklung postnekrotischer Granulome.

Die Milz ist ebenfalls geschwollen, dunkelrot und mit kleinen weißlichen Herden durchsetzt. Es besteht eine Follikelhyperplasie mit unspezifischen kerntrümmerphagozytierenden Retikulumzellen (GÜTTNER, 1974). Die Lymphfollikel sowie die rote Pulpa werden nekrobiotisch; später setzt eine fibrotische Organisation der Milz ein (FENNER, 1948 a).

Pathologisch verändert sind ferner die regionären Lymphknoten in der Nähe des primären Infektionsherdes, das Knochenmark im Gefolge einer chronischen Form der I.E. und die Lungen, die im akuten Stadium eine eitrig-nekrotisierende, teils fibrinöse Bronchopneumonie aufweisen. Daraus kann sich später eine chronisch-granulierende, z.T. auch xanthöse Endobronchiolitis obliterans bzw.

eine kleinherdige, chronisch-karnifizierende Pneumonie mit interstitiellen Fibrosen entwickeln. Diese Lungenveränderungen werden zu den markantesten Befunden der I.E. gerechnet (GÜTTNER, 1974).

Auch hämorrhagische Darmentzündungen sowie Fettgewebnekrosen in der Bauchhöhle werden beschrieben (TRENTIN, 1953). Die zur klinischen Diagnose wichtigen Hautveränderungen kommen in subakuten und chronischen Fällen der MP zur Entwicklung.

Kutis und Subkutis sind anfangs ödematös geschwollen, und es bilden sich kleine Papeln. In fortgeschrittenem Stadium kommt es zu ulzerativen Prozessen und ausgedehnten Nekrosen in der Epidermis. Histologisch liegt eine hydropisch-retikulierende und ballonierende Degeneration der Epithelzellen vor. In den nekrotischen Zellen der Epidermis, der Haarfollikel und der Schweißdrüsen sieht man Kernpyknose und Karyolyse. Durch Anhäufung von Zelltrümmern und Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten und Lymphozyten wird ein Schorf gebildet, unter dem die Läsionen abheilen. Wenn der Schorf abfällt, bleibt eine haarlose Narbe zurück (FENNER, 1948 b).

Die für das EV typischen intrazytoplasmatischen eosinophilen Einschußkörperchen finden sich in Leber-, Milz- und Lymphknotenzellen, im Pankreas, in den Speicheldrüsen, im Schleimhautepithel des Respirations- und des Digestionstraktes sowie in der Epidermis (RÖHRER, 1967; SOAVE und LUND, 1970).

2.7. Diagnosemöglichkeiten

2.7.1. Serologische Verfahren

Im Verlauf einer natürlichen oder künstlichen MP-Infektion werden virusneutralisierende, komplementbindende, präzipitierende und hämagglutinationshemmende Antikörper gebildet. Vor allem letztere spielen für die Serodiagnose der I.E. eine wichtige Rolle, auch wenn sie nicht immer eine vorausgegangene Infektion mit EV anzeigen. Hämagglutinationshemmende Antikörper werden nämlich auch nach Impfung mit Vaccinia-Virus (VV) gebildet. Sie können deshalb Anlaß zu Verwechslungen des sog. Impftiters mit einem Infektionstiter geben (BRIODY, 1959).

Trotz dieser immunologischen und serologischen Kreuzreaktionen wird die Hämagglutinations-Hemmungs-Reaktion (HAH-R) immer wieder als Methode der Wahl für eine technisch einfache und schnelle serologische Diagnose der MP-Infektion genannt (BRIODY, 1959; CARTHEW et al., 1977; TRENTIN und BRIODY, 1953). Sie ist vor allem bei Anwendung der Mikrotitrationstechnik rationell durchführbar, leicht abzulesen und ausreichend nachweissicher, so daß sie für die regelmäßige Überwachung von (nicht geimpften) Versuchstierbeständen geeignet erscheint (HORZINEK, 1965 a; ROHDE und KARASEK, 1970).

HAH-Antikörper treten in Abhängigkeit vom Infektionsmodus zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. auf, frühestens jedoch am 8. Tag. In der dritten Woche p.i. erreichen sie ein Titermaximum, um dann langsam wieder abzusinken (HORZINEK und HÖPKEN, 1965 b).

Präzipitierende Antikörper werden in der Agargel-Präzipitation nach OUCHTERLONY ab dem 10. Tag p.i. nachgewiesen.

Dieses Verfahren soll besonders für die Diagnose von inapparenten Infektionen geeignet sein und läßt sich auch routinemäßig leicht durchführen (HORZINEK, 1965 b und c).

Nach CHRISTENSEN (1966) stellt auch die Immunofluoreszenz eine verlässliche und empfindliche Methode dar, um bei klinisch inapparenten oder latenten Verlaufsformen der I.E. Antikörper nachzuweisen. Es wird die indirekte Darstellung von MP-Antigen bis zum 14. Tag p.i. empfohlen. Dagegen gibt KARASEK (1969) dem direkten fluoreszenz-serologischen Nachweis den Vorzug, weil damit auch in der dritten Krankheitswoche noch Aussicht auf Erfolg bestehen würde. Der Autor konnte allerdings nur beim Vorliegen deutlicher Haut- und Organveränderungen Virusantigen im Fluoreszenztest sichtbar machen.

Als allergische Hautreaktion ist der sog. "Tail-Test" einzustufen, bei dem eine Skarifikation der Haut der Schwanzwurzel mit Vaccinia-Antigen durchgeführt wird. Bei positivem Ausfall kommt es nach 8 bis 10 Tagen zu einer Schwellung an der Inokulationsstelle mit Blasenbildung oder einer rötlichen Zone im Zentrum des ödematisierten Gewebes (OWEN et al., 1975).

CARTHEW et al. (1976) setzten einen Immunodiffusionstest zur Diagnose der MP ein. Als Antigen diente homogener Hautschorf von erkrankten Tieren, der gegen Vaccinia-Virus-Antiserum ausgetestet wurde.

2.7.2. Klinische Diagnose

Bei subakutem und chronischem Verlauf der MP-Infektion kann unter Berücksichtigung epidemiologischer Verhältnisse die Diagnose anhand der klinischen Symptome mit

einiger Wahrscheinlichkeit gestellt werden.

In Verdachtsfällen (akuter oder latenter Verlauf) kommt man ohne zusätzliche Untersuchungen nicht aus (Pathologie, Histopathologie, Serologie).

Zur endgültigen Absicherung der Diagnose dient der direkte oder indirekte Erregernachweis durch seine elektronenoptische Darstellung, durch die Virusisolierung in Zellkulturen und Hühnerbruteiern sowie durch Übertragungsversuche auf empfängliche gesunde Mäuse. Hierzu verimpft man am besten Leber- und Milzverreibungen, evtl. auch Serum oder Hauthomogenate.

Differentialdiagnostisch kommen in erster Linie Bißverletzungen in Betracht, besonders bei männlichen Tieren. Doch ist auch an anderen Viruserkrankheiten (z.B. Mäuse-Hepatitis-Virus-Infektion) sowie an bakteriell bedingte Septikämien (z.B. Pasteurellose, Listeriose) zu denken (RÖHRER, 1967; COHRS et al., 1958; JUHR und HILLER, 1973).

2.8. Bekämpfung und Kontrolle

Die zweckmäßigste und sicherste Bekämpfung der MP ist die Tötung und unschädliche Beseitigung aller kranken und Ektramelie-verdächtigen Tiere eines befallenen Bestandes mit entsprechender Stalldesinfektion und anschließendem Wiederaufbau einer I.E.-freien Neuzucht in Isolierstallungen (BRIODY, 1959; HERRLICH, 1967).

Um diese ultima ratio zu vermeiden, wird für große, konventionell gehaltene Mäusebestände die regelmäßige serologische Überwachung sowie die prophylaktische Schutzimpfung aller Zuchttiere mit aktivem Vaccinia-Virus gefordert, falls eine spf-Zucht nicht möglich ist. Solche Kontroll- und Vorsorgemaßnahmen werden schon seit langem erfolgreich

und in großem Umfang durchgeführt (BRIODY, 1959; TRENTIN und FERRIGNO, 1957).

Noch nicht über das Experimentierstadium hinaus gelangten Versuche, MP chemotherapeutisch (z.B. mit Derivaten von Isatin- β -Thiosemicarbazone) bzw. mit exogenem oder endogenem Interferon zu beeinflussen (BAUER und SADLER, 1961; SUBRAHMANYAN und MIMS, 1967).

2.9. Immunitätsverhältnisse bei Mäusepocken

Mäuse, die eine natürliche oder künstliche Infektion mit EV überleben, haben in der Regel eine aktive, belastbare und meist lebenslängliche Immunität erworben. Sie beruht auf humoralen und zellulären Abwehrmechanismen (FENNER, 1949 a; HERRLICH, 1967).

2.9.1. Die humorale Immunität

Die Infektion mit MPV ruft die Bildung spezifischer virusneutralisierender, komplementbindender, präzipitierender und hämagglutinationshemmender Antikörper hervor. Sie stellen die Grundlage der humoralen Immunität dar (HORZINEK und HÖPKEN, 1965 b).

Den letztgenannten kommt eine besondere Bedeutung im Rahmen der Serodiagnose einer MP-Infektion zu. Ihr Nachweis spricht für eine überstandene oder noch ablaufende MP-Infektion. Die Hämagglutinations-Hemmungs-Reaktion (HAH-R) kann sowohl mit EV als auch mit VV als Antigen durchgeführt werden. Nach BRIODY (1959) ist allerdings der mit dem heterologen Vaccinia-Antigen festgestellte Titer um die Hälfte niedriger als der mit homologem Ektromelie-Antigen gefundene Wert. Trotzdem wird im allgemeinen VV-Antigen verwendet, weil dessen Herstellung technisch wesentlich einfacher

und für Versuchstierlabors mit geringerem Risiko für die Tiere verbunden ist (MUNZ: pers. Mitteilung).

Während der 50er Jahre untersuchten TRENTIN und BRIODY (1953), TRENTIN und FERRIGNO (1957) sowie BRIODY (1959) in den USA mehrere seuchenhafte Erkrankungen, bei denen Verdacht auf MP bestand, mit Hilfe der HAH-R. Die Autoren fanden in den meisten Fällen niedrige, jedoch signifikante Titer. BRIODY (1959) weist darauf hin, daß zu Beginn einer MP-Epidemie oft noch keine HAH-Antikörper nachweisbar sind, da die Tiere schon vor deren Ausbildung bei perakutem Verlauf der Erkrankung sterben.

Bei weniger fulminant verlaufenden Epidemien werden in der frühen Phase meist niedrige HAH-Titer gefunden, während 1 bis 2 Monate später alle klinisch kranken Tiere hohe Titer aufweisen. Selbst Seren klinisch gesunder Mäuse aus einer enzootisch verseuchten Population zeigten noch zu 20 % positive Hemmungstiter. Diese Seren stammten von Mäusen aller Altersgruppen, was nach BRIODY (1959) für eine Erregerpersistenz spricht.

Die Bildung von HAH-Antikörpern setzt nach intraplantarer Infektion am 8. Tag p.i. ein. Der Titer erreicht zwischen dem 14. und 17. Tag p.i. Maximalwerte und sinkt dann langsam ab (HORZINEK und HÖPKEN, 1965 b).

Bei enteral infizierten Tieren sind HAH-Antikörper frühestens am 9. Tag p.i. nachweisbar (HORZINEK und HÖPKEN, 1965 a).

Wie bei der Pockenwiederimpfung des Menschen, so erfolgt nach intraperitonealer und intranasaler Infektion von geimpften Mäusen auch eine beschleunigte Antikörperproduktion; hier ist ein allgemeiner Titeranstieg bereits am 3. bzw. am 6. Tag p.i. zu verzeichnen (HORZINEK und HÖPKEN, 1965 b).

Die Höhe des HAH-Titers wird bestimmt durch die Intensität und Dauer des antigenen Stimulus. Nach Infektion mit dem hochvirulenten EV-Stamm "Moskau" werden durchschnittliche Titer von 260, mit derselben Dosis des weniger virulenten Stammes "Hampstead" nur von 140 erreicht (FENNER, 1948 a).

Nach den Untersuchungen von FENNER (1948 a) an erwachsenen Tieren und an Säuglingsmäusen können die HAH-Antikörper zwar nicht die lokale Virusvermehrung am Inokulationsort, wohl aber die Generalisation und die Besiedelung der inneren Organe verhindern. Auch wenn ein großes Intervall zwischen Genesung und Reinfektion liegt, kommt es nur zu einer beschränkten Virusvermehrung und zum Wiederansteigen des Antikörperspiegels (FENNER, 1949 a). Schon vier Wochen nach Erstinfektion wird bei einer Reinfektion nur noch gelegentlich eine Ödematisierung der inokulierten Pfote beobachtet, wobei es sich wahrscheinlich um eine hyperergische Reaktion handelt; eine Generalisation wird vollständig unterdrückt. Auch neun Wochen, 14 Wochen und 12 Monate nach der Erstinfektion hielten die Tiere einer intraplantaren Belastungsinfektion stand. Es kam jedoch häufiger zu allergischen Reaktionen, vor allem unter den jüngeren Tieren. Nach intraperitonealer und intranasaler Belastung beobachtete FENNER (1949 a) einen Zusammenbruch der Immunität.

Beim Vergleich der HAH-Antikörpertiter von Überlebenden einer MP-Epidemie konnte er keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen feststellen. Auffallend war jedoch die hohe Mortalität unter den Säuglingsmäusen und bei den ganz alten Tieren. Die Überlebenden der Infektion mit MPV waren jedoch alle gleichermaßen gut geschützt (FENNER, 1949 d).

Präzipitierende Antikörper treten in Abhängigkeit von der Antigendosis frühestens ab dem 10. Tag p.i. auf. Mäuse, die auf oralem Weg inapparent infiziert worden sind und mit 10^6 LD₅₀-Einheiten intraperitoneal belastet werden, entwickeln präzipitierende Antikörper schon ab dem 4. Tag p.i. Dieselbe Verkürzung des Intervalls wird auch bei mit Vaccinia-Virus geimpften Tieren beobachtet (HORZINEK, 1965 c).

Ähnliche Untersuchungen über virusneutralisierende und komplementbindende Antikörper bei einer Infektion mit EV sind uns aus der Literatur nicht bekannt.

Welchen der im Verlauf einer MP-Infektion gebildeten Serum-Antikörpern schließlich die entscheidende Abwehrfunktion bei einer Reinfektion zukommt, ist noch nicht geklärt. FENNER (1948 a) vertritt die Meinung, daß eine enge, wenn auch nicht absolute Korrelation zwischen dem HAH-Titer und dem Schutz gegenüber einer intraperitonealen Belastungsinfektion mit virulentem EV besteht.

2.9.2. Die zelluläre Immunität

Nach BLANDEN (1974) spielen für das Überstehen einer Erstinfektion mit EV zelluläre Abwehrmechanismen die entscheidende Rolle, während für die Abwehr einer Reinfektion humoralen Faktoren die größere Bedeutung zukommt. Das Schlüsselereignis scheint hierbei die Rekrutierung von mononukleären Phagozyten in den Leberläsionen durch spezifisch aktivierte sog. T-Zellen oder Effektorzellen zu sein. Sie stammen von den kleinen Lymphozyten ab. Die T-Zellen kontrollieren die Virusvermehrung im Leberparenchym bereits schon 4 bis 6 Tage p.i., also noch vor dem Auftreten nachweisbarer Antikörper im Serum. Diese

sensibilisierten T-Zellen erkennen infizierte Wirtszellen an virusspezifischen Antigenen, die in die Zellmembran eingelagert sind. Dies bewirkt eine entzündliche Zellinfiltration in den nekrotischen Bezirken (BLANDEN, 1974; PETIT und DAGUET, 1977). An dieser Zellreaktion sind polymorphkernige Leukozyten und aktivierte Makrophagen beteiligt; es dominieren jedoch letztere in Anzahl und Funktion, da sie infektiöses Virus und nekrotisches Gewebe phagozytieren und eliminieren. So wird die Infektion eingedämmt und die Genesung letzten Endes ermöglicht (BLANDEN, 1974).

Nach Absinken der Antigenkonzentration im lymphoiden Gewebe, d.h. nach Eliminierung des Virus, nimmt auch die Anzahl der kurzlebigen Effektorzellen ab. Sie teilen sich nun nicht mehr oder nur noch langsam (BLANDEN, 1974).

Die in-vitro-Zytotoxizität gegenüber virusinfizierten Zellen ist ebenfalls eine Funktion der T-Zellen. Beide Funktionen, die antivirale Aktivität in vivo und die in-vitro-Zytotoxizität sind an einen bestimmten Genkomplex gekoppelt, der in den T-Zellen und in den infizierten Wirtszellen bzw. in Zellspendern und -empfängern identisch sein muß (PETIT und DAGUET, 1977).

Durch Gaben von Anti-Maus-Thymozytenserum kann die zelluläre Immunität unterdrückt werden: Bei i.v. mit VV infizierten Mäusen kommt es zu einer Steigerung der Morbidität und Mortalität, da sich das Virus ungehindert in den inneren Organen vermehren kann. Die immunsuppressive Wirkung des Anti-Thymozytensersums beruht jedoch nicht auf einer verminderten Antikörper- oder Interferonproduktion, sondern auf der deutlich herabgesetzten zellulären Immunität. Charakteristisch dafür ist die Erschöpfung der Lymphozytenspeicherorgane Milz und Lymphknoten (HIRSCH et al., 1968).

Durch Übertragung von Milzzellen vaccinia-immuner Mäuse auf Säuglingsmäuse kann eine Schutzwirkung gegen die Infektion mit Vaccinia- und Variola-Virus erzielt werden (HOCHSTEIN-MINTZEL, 1969).

2.9.3. Die passive Immunität

Säuglingsmäuse, die vor dem 14. Lebenstag einer erstmaligen Infektion mit EV ausgesetzt sind, sterben stets innerhalb weniger Tage an der schnell fortschreitenden Virusvermehrung in Leber und Milz. Anscheinend ist ihre humorale und zelluläre Abwehrbereitschaft noch nicht funktionsfähig genug, um den letalen Ausgang der Infektion verhindern zu können.

Im Alter von drei Wochen besitzen Säuglingsmäuse bereits eine gewisse Altersresistenz gegenüber EV, die sie eine gleich große Belastung überstehen läßt (FENNER, 1949 d).

Anders liegen die Verhältnisse in endemisch verseuchten Mäusezuchten. Hier sind die Säuglingsmäuse durch den passiven Transfer mütterlicher Antikörper geschützt. Eingehende Untersuchungen über die Art der passiv erworbenen Immunität stammen von FENNER (1948 a). Er tauschte Säuglingsmäuse am Tage ihrer Geburt zwischen MP-immunen und nicht immunen Müttern aus und setzte die Jungen im Alter von 14 Tagen einer intraplantaren (i.pl.)-Belastungsinfektion mit virulentem EV aus. Es zeigte sich, daß die über die Plazenta erworbenen Antikörper den Verlauf der Krankheit nicht beeinflussen konnten, während die über die Milch übertragenen Antikörper einen effektiven Schutz vor dem tödlichen Ausgang der Infektion verliehen. Die Tiere widerstanden einer tausendfach höheren letalen Dosis des EV als alle Säuglingsmäuse, die von nicht immunen Müttern gesäugt wurden. Die Überlebenden

dieser Belastungsinfektion hatten höhere Antikörpertiter, als von dem passiven Transfer allein erwartet werden konnte; sie hatten sich also wahrscheinlich auch aktiv mit dem Virus auseinandergesetzt.

Durch den Austausch gleichaltriger Würfe zwischen immunen und nicht immunen Müttern konnte auch Aufschluß über die Quantität und Persistenz der passiv übertragenen Antikörper erhalten werden. FENNER (1948 a) ermittelte, daß der allein über die Plazenta erworbene Antikörpertiter der Säuglingsmäuse nur 1/10 des mütterlichen Serumtiters beträgt. Diese intrauterin übertragenen Antikörper sinken schnell ab und sind bereits am 14. Lebenstag völlig verschwunden.

Demgegenüber entspricht der Antikörpertiter, den Säuglingsmäuse ausschließlich über die Milch erhalten haben, der Hälfte des mütterlichen Serumspiegels. Dieser Titer hält bis zum Ende der dritten Lebenswoche an, nach dem Absetzen am 21. Lebenstag fällt er langsam ab und ist erst gegen Ende der sechsten Lebenswoche nicht mehr nachweisbar (FENNER, 1948 a).

Spätere Untersuchungen von BRAMBELL (1958) haben gezeigt, daß maternale Antikörper bei den Nagetieren nicht über die Plazenta, sondern über Dottersack und Amnionflüssigkeit übertragen werden. Ab dem 11. Trächtigkeitstag soll eine Anreicherung von Immunglobulinen im Dottersackepithel, ab dem 16. Trächtigkeitstag ihre selektive Übertragung auf den Fötus stattfinden.

Die Aufnahme maternalen Antikörper aus dem Kolostrum erfolgt bei Nagern ebenfalls selektiv. Während des Resorptionsvorganges soll es zu einer Interferenz von heterologen Immunglobulinen im Darm kommen; auch eine Verminderung der Antigenspezifität soll möglich sein. Die Fähigkeit zur Resorption ist individuell verschieden,

sie soll jedoch bei der Maus um den 16. Lebenstag beendet sein (GRUBER, 1975).

Von Interesse sind in diesem Zusammenhang vor allem die Ergebnisse von MAHNEL und MUNZ (1965), daß auch bei der Variola-Infektion der Babymaus ähnliche Verhältnisse herrschen. Die Autoren konnten durch aktive Immunisierung von weiblichen weißen Mäusen mit Variola-Virus eine Immunität erzeugen, die auf die hochempfindlichen Säuglingsmäuse intrauterin und galaktogen übertragen wurde und sie vor einer hochdosierten Belastung mit virulentem Variola-Virus schützte.

Auch HERRLICH et al. (1968) konnten durch Impfung trager Mäuse mit Vaccinia-Virus einen weitgehenden Schutz der Säuglingsmäuse gegenüber virulentem Variola-Virus erzielen. Es zeigte sich jedoch, daß der Grad der Immunität im wesentlichen von dem für die Impfung verwendeten Vaccinia-Stamm abhängig war.

Der Mäusefötus ist aber nicht ausschließlich auf den von der Mutter passiv erhaltenen Schutz angewiesen (vgl. S. 22). Grundsätzlich kann er schon ab dem 14. Trächtigkeitstag als immunologisch kompetent gelten, da zu diesem Zeitpunkt die Lymphozytenbildung im Thymus einsetzt. Die Plasmazellbildung und Antikörperproduktion beginnt zwar normalerweise erst nach der Geburt, sie ist jedoch auf entsprechenden antigenen Reiz hin auch schon vor der Geburt möglich (BUSCHMANN, 1970). Inwieweit solche pränatal gebildeten Immunzellen und Antikörper eine Rolle für die Abwehr von Infektionen in der Neugeborenenphase spielen, ist allerdings noch ungeklärt.

Anscheinend sind schon 4 bis 5 Tage alte Säuglingsmäuse zu einer spezifischen Immunreaktion in der Lage. Dies wird durch die Untersuchungen von HOCHSTEIN-MINTZEL et al. (1968 b) belegt, als sie Saugmäuse aktiv mit Vaccinia-

Virus subkutan immunisierten. Die geimpften Tiere überlebten eine i.p.-Belastungsinfektion mit hohen Dosen des homologen Virus. Diese aktive Immunisierung der Bymäuse verleiht auch einen guten Schutz gegenüber einer Infektionsbelastung mit Variola-Virus (HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1968 a).

2.10. Die Immunität nach Impfung

2.10.1. Serologische Beziehungen zu anderen Viren des Genus Orthopox

Das EV ist serologisch und immunologisch einheitlich. Verwandtschaftliche Beziehungen bestehen zu allen anderen Orthopoxviren. So besitzt das EV ein Hämagglutinin, das mit dem des Vaccinia-Virus eng verwandt ist. Beide Hämagglutinine reagieren einheitlich, d.h. sie können sich gegenseitig in der HAH-Reaktion vertreten (HERRLICH, 1967).

Serologische Untersuchungen mittels des Virusneutralisationstests auf der CAM des Hühnerbruteis ergaben, daß eine fast vollständige Kreuzneutralisation zwischen dem EV, dem Vaccinia-, Variola- und Kuhpocken-Virus besteht (MC CARTHY und DOWNIE, 1948). Die Kreuzimmunität zum VV wurde deshalb schon bald von BURNET und BOAKE (1946) für die heterologe Immunisierung gegen MP praktisch genutzt.

Mit Hilfe der Komplementbindung, Geldiffusion, Ringpräzipitation, Hämagglutinationshemmung, Pocken- und Plaque-Neutralisation und der Färbung Fluoreszein-markierter Antikörper fanden WOODROOFE und FENNER (1962), daß spezifische Kreuzreaktionen nur innerhalb des Genus Orthopoxvirus möglich waren, jedoch nicht mit anderen Pockenviren.

BAXBY (1975) nimmt an, daß die verwandtschaftliche Beziehung des EV zum Kuhpockenvirus noch enger ist als zu den anderen genannten Spezies der Variola/Vaccinia-Untergruppe. Er geht dabei nicht nur von den gemeinsamen serologischen Eigenschaften, sondern auch von der Fähigkeit dieser beiden Viren aus, in infizierten Zellen Typ A-Einschlußkörperchen zu bilden.

Aus den Ergebnissen eines speziellen Neutralisationstests, in dem Antiserum gegen hitzeinaktiviertes VV verwendet wurde, ist jedoch nach BAXBY (1977) zu schließen, daß das EV dem Kamelpocken- und Büffelpockenvirus sowie dem Isolat "MK-10", einem afrikanischen Affenpockenvirus, serologisch näher steht als den übrigen Mitgliedern des Genus Orthopox.

2.10.2. Impfstoffe und -methoden

Die obengenannten engen verwandtschaftlichen Beziehungen fanden 1946 ihren praktischen Niederschlag in der Anwendung VV-haltiger Impfstoffe zur Immunisierung von Mäusezuchten gegen die I.E.

Die zuerst verwendeten Impfstoffe waren Dermovaccinia-Lymphen vom Schaf oder Rind; später ging man auch dazu über, Brutei-Vakzinen für die Impfung gegen MP einzusetzen. Es wurden die verschiedensten VV-Stämme mit den unterschiedlichsten Inokulationsrouten auf ihre Unschädlichkeit und immunogene Wirksamkeit geprüft.

FENNER (1947 a) glaubte, daß Mäuse am besten mit verdünnten VV-Suspensionen auf intranasalem Wege geimpft werden können. Dieses Verfahren führte infolge einer beträchtlichen Virusvermehrung zur Ausbildung hoher HAH-Titer. Der am 14. Tag p.vacc. ermittelte Titer soll nach FENNER (1947 a) ein guter Maßstab für eine bestehende Immunität gegenüber einer i.p.-Challenge-Infektion mit virulentem

EV sein.

Allerdings ist die Immunität, die durch Überstehen einer natürlichen MP-Infektion erworben wird, dauerhafter und belastbarer. Sie hält über ein Jahr an und gewährleistet bei einer Reinfektion, daß die Virusvermehrung auf die Eintrittspforte beschränkt bleibt. Demgegenüber kann die aktive Immunisierung mit VV unter Umständen nur eine herabgesetzte Virusvermehrung in den inneren Organen und einen abgeschwächten Krankheitsverlauf bewirken (FENNER, 1949 a; vgl. S. 18).

Eine erfolgreiche Immunisierung bedingt eine bestimmte, ausreichend hohe Impfvirusdosis. Nur dann wird die Produktion von genügend HAH-Antikörpern ausgelöst. Der HAH-Impftiter fällt zwar im Laufe der Zeit auf ein niedrigeres Niveau, aber die Immunität bleibt doch in größerem Umfang erhalten, als es das serologische Bild vermuten läßt (FENNER, 1949 b).

Während eines Ektromelie-Ausbruchs in den USA konnte die intranasale Instillation von VV erfolgreich zur Immunisierung eingesetzt werden. Alle geimpften Tiere besaßen einen wirksamen Schutz (TRENTIN und BRIODY, 1953).

Breitere Anwendung als die intranasale Impfstoffapplikation fand die einfach durchzuführende kutane Vakzinierungsmethode. Hierbei wurde die Haut an der Schwanzwurzel skarifiziert und der Impfstoff eingerieben. Geht die Impfung an, so kommt es an der Impfstelle zu einer lokalen Pustelreaktion. Dies kann insofern von Vorteil sein, als der Impferfolg leicht kontrolliert werden kann. Nach TRENTIN und FERRIGNO (1957) erwies sich die Skarifikationsimpfung mit VV als ebenso wirkungsvoll wie dessen intranasale Applikation.

Die Impfung mit VV induziert HAH-Antikörper (vgl. oben).

Diese Impftiter können sich evtl. bei epidemiologischen und diagnostischen Untersuchungen als nachteilig herausstellen. BRIODY (1959) empfahl deshalb, die Impfung gegen MP nur mit dem VV-Stamm IHD-T durchzuführen, da dieser kein Hämagglutinin mehr bildet, so daß die Anwendung des HAH-Tests für die Diagnose der I.E. in einem geimpften Mäusebestand nicht eingeschränkt wird. Das Verfahren fand jedoch keine breite Anwendung.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Autoren gelangten ZELLER und RECKZEH (1965 a u. b) zu der Auffassung, daß auch durch i.p.-Inokulation von VV eine belastbare Immunität gegenüber MP erzielt werden kann. Dabei ist die Stärke des Impfschutzes abhängig von der Dosis des verwendeten Impfvirus. Weibliche Tiere entwickeln nach i.p.-Immunisierung eine stärkere Immunität als männliche. Durch i.p.-Revakzinierung kann eine volle Wiederauffrischung des Impfschutzes erreicht werden. Die Dauer der Immunität nach einmaliger Impfung beträgt ca. 5 Monate, durch Wiederholungsimpfung kann sie nochmals um 12 bis 26 Wochen verlängert werden.

ZELLER und RECKZEH (1965 a u. b) konnten mit handelsüblicher Pockenlymphe und mit Gewebekulturimpfstoff dieselbe Schutzwirkung erzielen wie mit einer Brutei-Vakzine.

Die i.p.-Immunisierung gegen I.E. wird gut vertragen, sie ist wenig arbeitsintensiv, kaum zeitaufwendig und vor allem preislich vertretbar. Das Verfahren hat außerdem den Vorteil, daß ein ungewolltes artefiziell Verbreiten des VV in die Umgebung weitgehend vermieden wird.

Neuere Untersuchungen von MUNZ et al. (1974) befassen sich mit der Möglichkeit einer oralen Immunisierung gegen MP. Die Autoren testeten den hochattenuierten VV-Stamm CVA (heute als "MVA" bezeichnet) und den nicht

attenuierten VV-Stamm CVB; beide waren Flüssig-Gewebe-kultur-Impfstoffe.

Eine belastbare Immunität konnte allerdings nur durch mehrmalige perorale Sondenapplikation von konzentrierter Virussuspension ($3 \times 10^{7,5}$ bzw. $10^{6,75}$ KID₅₀) erreicht werden. Nach freiwilliger Impfstoffaufnahme über die Tränke ($3 \times 10^{7,5}$ bis $10^{8,5}$ KID₅₀) kam es nur zu einem unzuverlässigen Immunisierungserfolg. Dies führen die Autoren auf die rasche Inaktivierung des VV im Magen sowie auf seinen fehlenden Kontakt mit der respiratorischen Schleimhaut, der anscheinend für die Ausbildung einer guten Immunität notwendig ist, zurück.

MUNZ et al. (1976) versuchten ferner, mit einer Aerosol-Vakzinierung den natürlichen Infektionsweg der MP nachzuahmen, um so bessere Impferfolge zu erzielen. Es kamen die VV-Stämme CVA (hochattenuiert) und CVB (nicht attenuiert) und der als attenuiert geltende EV-Stamm "Hampstead" zur Anwendung. Letzterer ließ jedoch bei konzentrierter Applikation noch eine Restvirulenz erkennen. Die Aerosol-Impfung mit CVB ($10^{6,3}$ KID₅₀) und "Hampstead" ($10^{4,8}$ KID₅₀) vermochte einen vollständigen Schutz gegenüber einer i.p.-Belastungsinfektion mit 10^2 LD₅₀ des virulenten EV-Stammes "Düsseldorf E 2" zu induzieren, während mit CVA ($2 \times 10^{6,3}$ KID₅₀) nur eine unzureichende Immunität erzeugt werden konnte. Nach i.p.-Applikation von $10^{6,0}$ KID₅₀ verlieh jedoch auch dieser Stamm einen belastbaren Infektionsschutz. Der attenuierte MPV-Stamm "Hampstead" rief auch noch mit $10^{4,0}$ KID₅₀, d.h. in hundertfach geringerer Konzentration als VV, eine vollkommene Immunität hervor, unabhängig davon, welcher Applikationsmodus angewandt wurde.

MUNZ et al. (1976) empfahlen für die rationelle Durchführung der Vakzinierung von Mäusebeständen die i.p.-

Applikation des avirulenten VV-Stammes CVA, da dieser bei i.p.-Anwendung ausreichend immunogen und relativ ungefährlich für Mensch und Tier ist. Einer allgemeinen Anwendung der Aerosol-Impfung stehen nach Aussage der Autoren vor allem technische Schwierigkeiten (z.B. Impfkammer zur Verhinderung der Impfvirusverbreitung) entgegen.

2.10.3. Zur Problematik der Verwendung von Pockenimpfstoffen in der Versuchstierzucht

Die bisher geübte Praxis, Mäuse gegen MP mit Impfstoffen zu immunisieren, die aktives VV enthalten, ist mit einer Reihe von vielfach unterschätzten Problemen belastet. VV ist generell ein für den nicht immunen Menschen pathogener Erreger. Seine Verabfolgung auf breiter Basis in Mäusezuchten birgt besonders bei nicht voll attenuierten VV-Stämmen eine ungewollte Infektionsgefahr für den Menschen in sich. Besonders gefährdet sind natürlich nicht pockenschutzgeimpftes Stallpersonal und andere Personen, die Kontakt mit den geimpften Tieren und den Gegenständen ihrer Umgebung wie mit Käfigen usw. haben.

Das sehr breite Wirtsspektrum des VV läßt es darüber hinaus möglich erscheinen, daß das Virus auch auf andere Tierarten verschleppt und so weiter verbreitet wird. Die seuchenhygienischen Abschirmmaßnahmen von Mäusen in Langzeitversuchen mögen zwar den genannten Gefahren entgegenwirken, sie bieten jedoch keine absolute Gewähr für Sicherheit im Hinblick auf eine Einschleppung von MP als auch bezüglich der Verbreitung eines Impfvirus.

Die fast vollständige weltweite Ausrottung der Variola des Menschen wird ganz allgemein von einer sinkenden Impfbereitschaft der Bevölkerung gegen diese Krankheit

gefolgt sein. Immer mehr Staaten erleichtern bzw. heben die gesetzliche Impfpflicht bereits auf. So ist z.B. in der BRD seit 18. Mai 1976 die Erstimpfpflicht der Kleinkinder erlassen. Auch die Zahl der Wiederimpfungen sinkt ständig. Selbst Personen, für die eine Impfpflicht noch Vorschrift ist bzw. empfohlen wird, werden nicht vollständig erfaßt. Zu diesem Personenkreis gehört u.a. auch Personal, das in Viruslaboratorien arbeitet oder mit Viren der Poxgruppe in Kontakt kommen kann. Ein Absinken des Immunstatus der Gesamtbevölkerung bzw. eine zunehmende Empfänglichkeit für Pockenvirusinfektionen wird mehr und mehr die Folge sein.

Bei Impfungen von Tieren mit VV-haltigen Impfstoffen ist deshalb besondere Vorsicht geboten. Teilweise ist diese Gefahr schon erkannt; Institute, die bisher MP-Impfstoff auf der Basis von aktivem VV herstellten und an große Zuchten zur Immunisierung der Tiere abgaben, stellten aus diesem Grunde die Produktion ein.

Einen Ausweg aus dieser Situation scheint der hochattenuierte Impfstamm MVA zu bieten. Er leitet sich vom VV-Stamm "Ankara" ab, der über mehr als 500 Zellkulturpassagen in FHE-Zellen in seinen biologischen und serologischen Eigenschaften weitgehend modifiziert wurde. Dabei sind auch seine hämagglutinierenden Aktivitäten zum größten Teil verloren gegangen (MAYR und MUNZ, 1964).

MVA besitzt eine stark herabgesetzte Virulenz für das Versuchstier und verfügt über gute protektive Eigenschaften. Selbst hochempfindliche Babymäuse im Alter von 1 bis 7 Tagen vertragen eine i.cer.- oder i.p.-Immunisierung mit MVA gut und sind gegenüber einer nachfolgenden Belastungsinfektion mit virulentem VV geschützt (HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1972).

Nach MAYR et al. (1975) sowie MAYR (1976) kann der Stamm MVA wegen seiner Unschädlichkeit für Mensch und Tier und aufgrund seiner Immunogenität für die Prophylaxe und Bekämpfung von Orthopox-Viruserkrankungen deshalb in der Human- ebenso wie in der Tiermedizin generell empfohlen werden.

Diese positiven Eigenschaften des MVA-Stammes gelten jedoch nicht gleichwertig für alle Orthopoxviren. Nach MUNZ et al. (1976) immunisiert MVA-Virus nicht so gut gegen MP wie nicht attenuiertes VV. Es fehlen auch noch Erfahrungen aus der Praxis, die seinen Einsatz uneingeschränkt empfehlen lassen.

Die Alternative, auf attenuiertes MPV auszuweichen - MPV soll nach MOOSER (1943) am Menschen nicht "angehen" - erscheint nach den bisherigen Erfahrungen noch nicht praktikabel. MUNZ et al. (1976) berichten, daß der von ihnen für Immunisierungszwecke geprüfte sog. attenuierte Stamm "Hampstead" noch eine beträchtliche Restvirulenz besaß; 4 bis 5 Wochen alte Mäuse erkrankten noch nach i.p.-Infektion.

Die Überprüfung der Verwendbarkeit noch höherer Zellkulturpassagen des EV-Stammes "Hampstead" steht noch aus. Berücksichtigt man die Erfahrungen bei der Attenuierung anderer Pockenviren, z.B. beim Vaccinia-Virus, beim Hühner- und Kanarienvirulent, so erscheint denkbar, daß auch der Stamm "Hampstead" besser attenuiert und dann als Impfstoff eingesetzt werden kann.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Abkürzungen

EV = MPV	= Ektromelievirus = Mäusepockenvirus
E (Hamp.)	= Ektromelievirus-Stamm "Hampstead", "attenuiertes", auf Mäusefibroblasten gezüchtetes Virus
E (Cl.)	= clonisierter Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf E 2", auf Mäusefibroblasten gezüchtetes virulentes Virus
VV	= Vaccinia-Virus
MVA	= modifizierter Vaccinia-Virus-Stamm "Ankara", hochattenuiertes, auf Hühner- embryofibroblasten gezüchtetes Virus
CVB	= Vaccinia-Virus-Stamm "Bern", an embryo- nale Rindermuskelzellen adaptiertes, nicht attenuiertes Virus
CAM	= Chorioallantoismembran
3T6-Zellen	= permanente Mäusefibroblastenlinie der Fa. Flow Lab.
FHE-Zellen	= primäre embryonale Hühnerfibroblasten
EID ₅₀	= mittlere infektiöse Dosis für Bruteier
KID ₅₀	= mittlere infektiöse Dosis für Zellkulturen
LD ₅₀	= mittlere letale Dosis für Mäuse
HAH-Test	= Hämagglutinations-Hemmungs-Test
i.p.	= intraperitoneal
p.i.	= post infectionem
p.p.	= post partum
MEM	= Minimal Essential Medium (Hanks-Salze) der Fa. Seromed

PBS	=	phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco
PBST	=	phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco mit einem Gehalt von 0,25 % Trypsin
RAF	=	Rinderamnionflüssigkeit
zpE	=	zytopathischer Effekt

3.1.2. Medien

Für den Ansatz von Zellkulturen verwendeten wir folgende Medien:

Lactalbumin-Yeast-Medium mit 10 % Kälberserum diente zur Anzucht der FHE-Kulturen; RAF zur Erhaltung der Zellen.

Eagle-Medium, modifiziert nach DULBECCO (Fa. Flow Lab.) mit 10 % Kälberserum diente zur Anzucht der 3T6-Kulturen; MEM (Hanks-Salze) mit 2 % Kälberserum zur Erhaltung der Zellen.

Alle Medien enthielten Streptomycin, Penicillin-G-Na sowie Phenolrot in üblicher Dosierung. Sie waren durch Seitz-EKS I-Schichten steril filtriert.

3.1.3. Zellkulturen

Für die Anzüchtung und Vermehrung des benötigten EV- und VV-Materials verwendeten wir Kulturen aus FHE- bzw. 3T6-Zellen.

Die FHE-Zellkulturen wurden in Anlehnung an die von DULBECCO (1952) beschriebene Methode hergestellt. Die Embryonen entnahmen wir den Eiern am 10. Bebrütungstag, nachdem sie durch Abkühlen auf Kühlschranktemperatur getötet worden waren. Ständer, Flügel und Augen wurden entfernt, die Körper in eine 50 ml-Rekordspritze mit Veterinärkonus gefüllt und damit in einen Erlenmeyerkolben gepreßt.

Der Gewebebrei wurde mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar erschien. Nach einer Vortrypsinierung mit PBST für ca. 10 Minuten setzten wir dem Gewebe erneut PBST im Verhältnis 1:20 zu und trypsinierten für 2 Stunden bei 37° C auf dem Magnetrührer.

Dann filterten wir das PBST-Zell-Gemisch durch eine vierfache Mull-Lage, zentrifugierten 20 Minuten lang bei 250 g ab und entfernten den Überstand. Das Zellsediment resuspendierten wir mit einer Rekordspritze im Anzuchtmedium und filtrierten zum zweiten Mal durch einen sechsfachen Mullfilter.

Vor der Abfüllung in die Kulturgefäße stellten wir den Zellgehalt auf 500.000 Zellen/ml ein.

Roux-Schalen wurden mit je 100 ml und Leighton-Röhrchen mit je 2 ml der Zellsuspension beschickt. Die Bebrütungstemperatur betrug 37° C.

Nach 4 Tagen hatte sich ein dichter einschichtiger Zellrasen ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch Erhaltungsmedium ersetzt. Der Zellansatz in Roux-Schalen diente der Virusanzucht und -vermehrung, während die Leighton-Röhrchen für Virustitrationen verwendet wurden.

Die 3T6-Zellen züchteten wir in Vierkantkolben nach BREED-DEMETER unter Verwendung von Eagle-Medium. Bereits nach 2 bis 3 Tagen waren die Zellen zu einem dichten einschichtigen Zellrasen ausgewachsen. In diesem Stadium tauschten wir das Anzuchtmedium gegen Erhaltungsmedium aus, und die Kulturen konnten mit Virus infiziert werden.

Zur Passagierung der 3T6-Zellen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und PBST für die Dauer von 1 Minute auf die Zellkultur gegeben. Nach Entfernung des PBST stellten wir die feuchte Kultur in den Brutschrank zurück.

Das restliche PBST genügte, um innerhalb von 5 Minuten die Zellen von der Glaswand abzulösen. Sie konnten nun mit frischem Wachstumsmedium aufgenommen und resuspendiert werden. Diese Zellsuspension verdünnten wir im Verhältnis 1:6 zur Ausgangsmenge mit Medium und füllten sie dann zu je 20 ml erneut in Vierkantkolben ab. Die Bebrütung erfolgte bei 37° C.

3.1.4. Virusstämme

Zur Immunisierung der Mäuse und zur Belastungsinfektion kamen folgende Virusstämme zur Anwendung:

3.1.4.1. Impfstämme

- Die 551. FHE-Passage des VV-Stammes MVA,
- der VV-Stamm CVB und
- der MPV-Stamm E (Hamp.) als O. FHE-Passage nach 138 Passagen in 3T6-Zellen.

Für beide VV-Stämme waren ihre Unschädlichkeit für Mäuse sowie ihre immunogene Wirksamkeit gegen I.E. bereits bekannt (MUNZ et al., 1974 a, 1976).

3.1.4.2. Challenge-Virus

Für die Belastungsinfektion der immunisierten Mäuse verwendeten wir den virulenten MPV-Stamm "Düsseldorf E 2". Er kam als O. FHE-Passage nach 162 Passagen in 3T6-Zellen und als 202. 3T6-Passage zur Anwendung.

3.1.5. Viruszüchtung

Die EV-Stämme wurden in der Regel auf 3T6-Zellkulturen angezüchtet und vermehrt.

Vierkantkolben beimpften wir mit 10 ml einer 1:10 mit Erhaltungsmedium verdünnten Virussuspension und inkubierten für 3 Stunden bei 37° C. Danach saugten wir nicht-adsorbiertes Virus mit dem Medium ab, wuschen die Kultur mit MEM und gaben dann 20 ml frisches Erhaltungsmedium zu. Die beimpften 3T6-Kulturen wurden bei 35° C gehalten und täglich der sich entwickelnde zpE kontrolliert. Dieser setzte am 2. Tag p.i. ein und entsprach dem in der Literatur beschriebenen.

Noch vor der vollständigen Lysis des Zellrasens (i.d. R. am 3. Tag p.i.) wurden die infizierten Zellkulturen bei -20° C eingefroren. Beim raschen Wiederauftauen wird intrazelluläres Virus freigesetzt. Nach kurzem Abzentrifugieren der Zellen aus der Virus-Zell-Suspension bei 1000 g wurde der infektiöse Überstand portionsweise abgefüllt und bei -20° C eingefroren.

Zur Anzüchtung und Vermehrung des als Impfstoff verwendeten VV-Stammes MVA beimpften wir Monolayerkulturen aus FHE-Zellen. Das Virusmaterial wurde im Verhältnis 1:8 mit RAF verdünnt und Roux-Schalen mit je 80 ml der Virussuspension beschickt. Nach dreistündiger Inkubationszeit bei 37° C wurde nicht-adsorbiertes Virus entfernt, die FHE-Kultur mit PBS gewaschen und sodann 100 ml RAF zugegeben.

Die beimpften FHE-Kulturen verblieben bei 37° C, bis sich ein typischer zpE entwickelt hatte. Dieser machte sich ab dem 2. Tag p.i. bemerkbar und bestand in herdförmiger Quellung und Abkuglung der Zellen. Später kam es zur Schrumpfung und Granulierung des Zytoplasmas und zur Generalisierung des Effekts. Noch vor Einsetzen der totalen Lysis (i.d.R. am 3. Tag p.i.) wurde das Virusmaterial geerntet. Dazu froren wir die Gewebe-

kulturschalen bei -20°C ein und tauten sie unter Schütteln wieder auf, um zellgebundenes Virus freizusetzen. Diesen Vorgang wiederholten wir insgesamt dreimal, um eine optimale Virusausbeute zu erhalten. Danach wurden die Zellbestandteile bei 1000 g kurz abzentrifugiert, der Überstand in Portionen zu 20 ml abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

Zur Anzüchtung und Gewinnung von Infektionsmaterial sowie zur Durchführung der Titrationen wurden die beiden MPV-Stämme E (Hamp.) und E (Cl.) ebenfalls auf FHE-Kulturen verimpft, um vergleichbare Titer ermitteln zu können. Zu diesem Zweck wurden die 138. 3T6-Passage E (Hamp.) und die 162. 3T6-Passage E (Cl.) jeweils im Verhältnis 1:8 mit RAF verdünnt, damit Roux-Schalen mit FHE-Kulturen beimpft und bei 35°C bebrütet. Im übrigen verfahren wir dabei in der gleichen Weise wie mit dem VV-Stamm MVA.

3.1.6. Virustitrationen

3.1.6.1. KID₅₀-Bestimmung

Titerbestimmungen der Impfvirusstämme MVA, CVB und E (Hamp.) sowie des Challenge-Virus E (Cl.) führten wir auf FHE-Kulturen durch. Dazu verimpften wir in Zehnerpotenzen verdünnte Virussuspensionen auf Leighton-Röhrchen, die nach Entfernung des Wachstumsmediums 1 ml RAF erhielten. 4 Röhrchen pro Verdünnungsstufe wurden mit je 1 ml der Virusverdünnungen 10^0 bis 10^{-7} beschickt. Die Endablesung erfolgte am 7. Tag p.i. Für die genannten Virusstämme ergaben sich folgende KID₅₀-Werte (Berechnung nach KÄRBER, 1931):

- VV-Stamm <u>MVA</u>	
(551. FHE-Passage)	$10^{6,5}$ KID ₅₀ /ml
- VV-Stamm <u>CVB</u>	
(Charge-Nr. 1751)	$10^{7,0}$ KID ₅₀ /ml
- EV-Stamm " <u>Hampstead</u> "	
(0.FHE- nach 138 3T6-Passagen)	$10^{5,0}$ KID ₅₀ /ml
- EV-Stamm " <u>Düsseldorf E 2</u> "	
(0.FHE- nach 162 3T6-Passagen)	$10^{5,5}$ KID ₅₀ /ml

3.1.6.2. EID₅₀-Bestimmung

Die verwendeten Virusstämme (mit Ausnahme des VV-Stammes CVB) wurden auch auf der CAM des Hühnerbruteis titriert, um Vergleichswerte zu den in FHE-Kulturen ermittelten Titern zu erhalten.

Im einzelnen hielten wir uns an das für die Beimpfung der gesenkten CAM übliche Verfahren (MAYR, 1955). Pro Virusverdünnungsstufe verwendeten wir 5 Eier. Bis zum 2. Tag p.i. abgestorbene Eier wurden verworfen. Die Endauswertung erfolgte am 4. Tag p.i., wobei wir nur feststellten, ob sich spezifische Veränderungen auf der Membran gebildet hatten oder nicht. Die EID₅₀-Werte wurden dann nach KÄRBER (1931) errechnet. Es konnten folgende Titer bestimmt werden:

- VV-Stamm <u>MVA</u>	
(551. FHE-Passage)	$10^{6,5}$ EID ₅₀ /ml
- EV-Stamm " <u>Hampstead</u> "	
(0.FHE- nach 138 3T6-Passagen)	$10^{5,5}$ EID ₅₀ /ml
- EV-Stamm " <u>Düsseldorf E 2</u> "	
(0.FHE- nach 162 3T6-Passagen)	$10^{4,5}$ EID ₅₀ /ml

3.1.6.3. LD₅₀-Bestimmung

Um Anhaltspunkte über die Virulenz der zur Immunisierung bzw. zur Challenge-Infektion verwendeten EV-Stämme für Mäuse unterschiedlichen Alters zu erhalten, titrierten wir verschiedene Zellkulturpassagen der beiden EV-Stämme auf infantilen und erwachsenen Tieren.

Die infantilen Mäuse waren 4 bis 5 Tage alt. Die Wurfgröße wurde auf 10 Stück eingestellt, und alle Tiere eines Wurfes wurden mit je 0,1 ml der nach Zehnerpotenzen verdünnten Virussuspensionen i.p. infiziert. Für die Titration auf erwachsenen Mäusen dienten ca. 4 Wochen alte weibliche Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20-25 g. Gruppen zu je 10 Mäusen erhielten ebenfalls ein Inokulum von 0,1 ml/Tier der obengenannten Virusverdünnungen i.p. injiziert.

Alle Arbeiten mit EV erfolgten grundsätzlich im Isolierstall, wo die Tiere täglich beobachtet und die Absterberaten registriert wurden. Gestorbene Tiere ohne erkennbare Ektromelie-Veränderungen wurden seziert und auf spezifische pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht. Über Entstehen und Verlauf von charakteristischen Krankheitssymptomen wurde sorgfältig bis zur Beendigung der Versuche Protokoll geführt.

Die Titrationsergebnisse (siehe Tabelle I) berechneten wir bei Säuglingsmäusen am 21. Tag p.i., bei erwachsenen Mäusen am 28. Tag p.i. nach der Methode von BONIN (1973).

Von den beiden VV-Stämmen MVA und CVB führten wir jeweils nur eine Titration auf Babymäusen durch. In Übereinstimmung mit den Befunden von MAYR et al. (1975) und MAYR (1976) erwies sich der Stamm MVA auch nach konzentrierter i.p.-Applikation von 0,1 ml als vollkommen

unschädlich für Säuglingsmäuse.

Im Gegensatz dazu zeigte der nicht attenuierte Stamm CVB noch eine gewisse Virulenz für infantile Mäuse, jedoch nicht für erwachsene. Der Titer betrug $10^{4,6}$ LD₅₀/ml.

Tabelle I: LD₅₀-Bestimmung verschiedener Zellkultur-Passagen der EV-Stämme E (Hamp.) und E (Cl.)

Virusstamm	Passagenzahl	LD ₅₀ -Werte in infant.Mäusen	LD ₅₀ -Werte in adult.Mäusen
E (Hamp.)	130. 3T6	$10^{6,8}$ /ml	$10^{1,4}$ /ml
	156. 3T6	$10^{7,3}$ /ml	$10^{1,5}$ /ml
	224. 3T6	$10^{5,8}$ /ml	n.d.
	0. FHE nach 138. 3T6	$10^{4,9}$ /ml	n.d.
E (Cl.)	154. 3T6	n.d.	$10^{5,8}$ /ml
	179. 3T6	$10^{7,8}$ /ml	$10^{4,6}$ /ml
	202. 3T6	$10^{7,7}$ /ml	n.d.
	248. 3T6	$10^{6,5}$ /ml	n.d.
	0. FHE nach 162. 3T6	$10^{6,8}$ /ml	n.d.
n.d. = nicht durchgeführt			

3.1.7. Versuchstiere und Versuchsbedingungen

Für unsere Immunisierungsversuche verwendeten wir männliche und weibliche Albino-Mäuse (Stamm NMRI) aus institutseigener Zucht sowie weiße spf-Mäuse (Stamm Ha/ICR Swiss) der Fa. MUS-RATTUS A.G., Brunnthal bei München. Sie wurden mit Pellet-Futter (Fa. Altromin, Lage/Lippe) ad lib. gefüttert und mit Leitungswasser ad lib. versorgt.

Gleichgeschlechtliche, zuchtreife Tiere hielten wir während des Immunisierungszeitraumes in Gruppen zu 6-8; zum Züchten setzten wir jeweils 4 ♀♀ und 2 ♂♂ zusammen; hochträchtige Weibchen wurden kurz vor dem Wurftermin einzeln gesetzt.

Die Haltung erfolgte in Makrolonkäfigen der Größe II mit nichtrostenden Edelstahldeckeln.

Immunisierte Tiere und Kontrolltiere hielten wir bis zum Zeitpunkt der Challenge-Infektion räumlich getrennt. Mit EV immunisierte Tiere ebenso wie Mäuse, die in einem Titrationsversuch oder Belastungsversuch mit EV standen, waren stets im Isolierstall untergebracht. Dieser ist mit einer Schleuseneinrichtung für Personen und Material ausgestattet.

Die Titrationsversuche wurden an insgesamt 260 adulten und 870 infantilen Mäusen durchgeführt.

Für die Immunisierungsversuche benötigten wir 165 weibliche Tiere; bei ca. 1650 Säuglingsmäusen prüften wir die Immunität durch Belastungsinfektion. Von den erwachsenen Tieren gewannen wir vor Versuchsbeginn durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus Blut. Das Serum von je 10 Mäusen wurde gepoolt und auf das Freisein von orthopoxvirusspezifischen, hämagglutinationshemmenden Antikörpern untersucht.

3.1.8. Immunisierungs- und Infektionsmethoden

Zuchtreife, noch nicht trächtig gewesene Mäuse immunisierten wir durch i.p.-Applikation der VV-Stämme MVA und CVB bzw. des EV-Stammes E (Hamp.) mit Volumina von 0,1 bzw. 0,5 ml (Dosisangabe: siehe Tabellen II, III und IV).

Die Immunisierung erfolgte entweder nur einmal oder zweimal im Abstand von 14 Tagen oder dreimal in 7tägigem Abstand. Die nur zum Züchten bestimmten männlichen Tiere immunisierten wir nicht.

Die Säuglingsmäuse wurden i.p. infiziert. Wir verabreichten die errechnete Belastungsdosis des EV-Stammes E (Cl.) in 0,1 ml.

Die i.p.-Infektion wählten wir, weil sie nach MUNZ (pers. Mitteilung) am besten dazu geeignet ist, sowohl eine exakt definierte Virusmenge zu verabreichen als auch ein sicheres "Angehen" der Infektion zu gewährleisten.

3.1.9. Virusnachweis in EV-infizierten Säuglingsmäusen

Zum Nachweis, ob nach der Belastungsinfektion unerwartet verendete Säuglingsmäuse immunisierter Mütter spezifisch an EV gestorben waren, versuchten wir, EV aus den Organen moribunder Babymäuse zu isolieren. Dazu töteten wir je eine solche am 3. Tag p.i. aus 10 verschiedenen Würfen, entnahmen Leber, Milz und Lungen und froren sie bei -20° C ein. Beim Wiederauftauen verrieben wir die Organe im Mörser und suspendierten sie im Verhältnis 1:5 mit PBS. Nach fünfminütigem Abzentrifugieren bei 2200 g verimpften wir je 0,1 ml des Überstandes auf die CAM 10 Tage alter Hühnerembryonen. Die

Eier wurden bei 35° C im Brutschrank inkubiert. Die Ablesung erfolgte am 5. Tag p.i. In analoger Weise gingen wir vor, um bei neugeborenen Säuglingsmäusen von mit E (Hamp.) immunisierten Müttern eine intrauterine Infektion mit EV nachzuweisen. Wir untersuchten die Organe dieser Babymäuse am 1. und am 12. Lebenstag.

3.1.10. Serumgewinnung

Zum Nachweis von HAH-Antikörpern im Serum der Versuchstiere entnahmen wir Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus. Dazu wurden sie kurz mit Äther narkotisiert und die Blutproben von jeweils 5-10 Mäusen derselben Versuchsgruppe vereinigt. Das bei 2200 g 10 Minuten lang abzentrifugierte Serum lagerte bis zur Auswertung bei -20° C.

Wir gewannen Sammelseren von:

- a) Überlebenden der Titrationsversuche am 28. Tag p.i. (adulte Mäuse) bzw. am 21. Tag p.i. (infantile Mäuse),
- b) immunisierten Müttern am 21. Tag nach der letzten Impfung,
- c) Säuglingsmäusen, die die Challenge-Infektion überlebt hatten, am 21. Tag p.i.

3.1.11. Hämagglutinations-Hemmungs-Reaktion (HAH-Reaktion)

Für den Nachweis orthopoxvirusspezifischer Antikörper im Serum immunisierter bzw. infizierter Mäuse benutzten wir die HAH-Reaktion. Wir hielten uns dabei an die von MAYR (1956) beschriebene Technik.

3.1.12. Versuchsanordnung

Ein 1. Vorversuch diente zur Prüfung der Immunisierungsmöglichkeit von trächtigen Mäusen gegen I.E. mit homologen und heterologen Orthopoxviren und der damit erreichbaren passiven Immunisierung der Jungtiere.

Wir immunisierten 30 weibliche Tiere im Alter von ca. 6-8 Wochen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Trächtigkeit, die eine Hälfte mit dem VV-Stamm MVA, die andere mit E (Hamp.).

Eine i.p.-Challenge-Infektion der Säuglingsmäuse zu verschiedenen Zeiten p.p. sollte dann Anhaltspunkte über die Belastbarkeit ihrer passiven Immunität vermitteln und Unterschiede bezüglich des Immunisierungszeitpunktes aufdecken. Zur Infektion diente der Stamm E (Cl.) in verschieden hoher Dosierung.

Jeweils die Hälfte eines Wurfes erhielt eine niedrigere, die andere Hälfte eine höhere Dosis. Die Markierung der Tiere erfolgte in üblicher Weise an den Extremitäten bzw. ab der zweiten Lebenswoche mit verdünnter Pikrinsäure am Fell.

Einzelheiten vermittelt die Tabelle II (siehe S.45).

Im 2. Vorversuch wollten wir klären, ob durch eine Erhöhung der Immunisierungs-Einzeldosis und durch eine zweimalige Impfstoffapplikation eine Verbesserung des Impfschutzes erzielt werden kann.

Dazu immunisierten wir mit den gleichen Virusstämmen 12 weibliche Mäuse jeweils 14 Tage vor und etwa zu Beginn der Trächtigkeit (= Decktermin). Davon abstammende Säuglingsmäuse wurden mit $10^{2,7}$ LD₅₀-Einheiten des Stammes E (Cl.) zu verschiedenen Zeiten p.p. belastet,

Tabelle II: Immunisierungsplan für die im 1. Vorversuch einmal geimpften weiblichen Mäuse und Infektionsplan für deren Nachkommenschaft

Impfvirus	Impfstoff-Dosierung u. -Applikation	Zeitpunkt der Immunisierung	Anzahl ♀♀	Zeitpunkt der Infektion der Babymäuse p.p.	Belastungsdosis/ Tier für je die Hälfte e. Wurfes
MVA	10 ^{5,5} KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.	7 Tage vor Decktermin	5	4, 12, 20 Tage bzw. 6 Wochen	10 ^{1,8} bzw. 10 ^{3,8} LD ₅₀
		gleichzeitig m. Decktermin	5		
		7 Tage nach Decktermin	5		
E (Hamp.)	10 ^{2,0} KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.	7 Tage vor Decktermin	5	4, 12, 20 Tage bzw. 6 Wochen	10 ^{1,8} bzw. 10 ^{3,8} LD ₅₀
		gleichzeitig m. Decktermin	5		
		7 Tage nach Decktermin	5		
Kontrollen	-	-	10	4, 12, 20 Tage bzw. 6 Wochen	10 ^{1,8} bzw. 10 ^{3,8} LD ₅₀

wobei wir die Tiere von je 4 Würfen derselben Altersgruppe zusammenfaßten. Je ein Wurf einer nicht immunisierten Mutter diente als Kontrolle.

Einzelheiten ergeben sich aus Tabelle III (siehe S.47).

Im Hauptversuch sollten die Ergebnisse der Vorversuche auf breiterer Basis kontrolliert und der Immunisierungsplan erweitert werden. Deshalb prüften wir neben den Virusstämmen MVA und E (Hamp.) auch den Stamm CVB vergleichend auf immunisierende Eigenschaften bei weiblichen Mäusen und zugleich die Belastbarkeit einer passiv übertragenen Immunität durch Challenge-Infektion der Säuglingsmäuse zu verschiedenen Zeitpunkten p.p.

Wir immunisierten 100 Mäuseweibchen im Alter von ca. 10 Wochen zweimal bzw. dreimal vor Beginn der Trächtigkeit. Ihre Babymäuse wurden auf fünf verschiedene Altersgruppen verteilt und jeweils 20 gleichaltrige Würfe von immunisierten Müttern zusammen mit vier Kontrollwürfen infiziert, wobei für die Belastungsinfektion mit $10^{1,7} \text{ LD}_{50}$ doppelt so viele Tiere (einschl. Kontrollen) verwendet wurden wie für die beiden anderen Gruppen. Die Wurfgröße stellten wir einheitlich auf 10 Säuglingsmäuse ein, indem wir gleichaltrige Tiere unter den Müttern derselben Immunisierungsgruppe austauschten. Die Belastungsinfektion erfolgte mit drei verschiedenen hohen Virusdosen des Stammes E (Cl.).

Die technischen Einzelheiten des Hauptversuches sind Tabelle IV zu entnehmen (siehe S.48).

Tabelle III: Immunisierungsplan für die im 2. Vorversuch zweimal geimpften weiblichen Mäuse und Infektionsplan für deren Nachkommenschaft

Impfvirus	Impfstoffdosierung und -Applikation im Abst. von 14 Tagen	1. Immunis.	2. Immunis.	Anzahl ♀♀	Alter der Babymäuse b. Belastung (Tage)	Anzahl der Babymäuse b. Belastung	Belastungs-dosis
MVA	5x10 ^{5,5} KID ₅₀ in 0,5 ml i.p.	5x10 ^{5,5} KID ₅₀ in 0,5 ml i.p.	6	6	4	22	10 ^{2,7} LD ₅₀
					11	21	
					18	22	
E. (Hamp.)	10 ^{2,0} KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.	10 ^{4,0} KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.	6	6	4	20	10 ^{2,7} LD ₅₀
					11	21	
					18	20	
Kontrollen	-	-	3	3	4	10	10 ^{2,7} LD ₅₀
					11	9	
					18	11	

Tabelle IV: Immunisierungsplan für die im Hauptversuch zwei- bzw. dreimal geimpften weiblichen Mäuse und Infektionsplan für deren Nachkommenschaft

Impfvirus	Immunis.- Modus	Impfstoffdosierung u. -Applikation		Anzahl ♀♀	Alter d. Babym.b. Belastg. (Tage)	Anzahl d.Babymäuse b. Belastg.mit log10 LD ₅₀	
		1.Immunis.	2.u.3.Immunis.			0,7	1,7
MVA	3x im Abst.v. 7 Tagen	5x10 ^{5,5}	5x10 ^{5,5}	20	4	je 10	je 20
		KID ₅₀ in 0,5 ml i.p.	KID ₅₀ in 0,5 ml i.p.		8		
					12		
					16		
					20		
CVB	2x im Abst.v. 14 Tagen	10 ^{6,0}	10 ^{6,0}	40	4	je 20	je 40
		KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.	KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.		8		
					12		
					16		
					20		
E (Hamp.)	2x im Abst.v. 14 Tagen	10 ^{2,0}	10 ^{4,0}	40	4	je 20	je 40
		KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.	KID ₅₀ in 0,1 ml i.p.		8		
					12		
					16		
					20		
Kontrollen	-	-	-	20	dto.	je 10	je 20
							je 10

4. Ergebnisse

4.1. Titrationen der Ektromelie-Virus-Stämme in adulten Mäusen

4.1.1. Titration des Stammes "Hampstead"

Wir titrierten die 130. und die 156. 3T6-Passage. Krankheitserscheinungen machten sich nur in den höchsten Konzentrationen (10^0 bis 10^{-2}) bemerkbar. Sie begannen am 3. bis 5. Tag p.i. und äußerten sich als Störung des Allgemeinbefindens mit verminderter Futter- und Wasseraufnahme, gesträubtem Fell und beschleunigter Abdominalatmung. Diese Symptome beobachteten wir bis zum 10. Tag p.i., doch traten vereinzelte Todesfälle bereits ab dem 4. Tag p.i. auf.

Pathologisch-anatomische Veränderungen gestorbener Tiere bestanden in exsudativer Pleuritis und Peritonitis, Lungenödem und -emphysem, Vergrößerung und fettiger Degeneration der Leber, in follikulärer Milzhyperplasie, hämorrhagischer Infiltration des Dünndarmes sowie in Fettgewebsnekrosen und Nierenschwellung.

Wir bestimmten die LD_{50} -Dosis auf $10^{1,4}$ bzw. $10^{1,5}/ml$.

Die Virusverdünnung 10^{-2} löste noch bei einem Teil der Tiere Symptome einer chronisch verlaufenden Ektromelie aus. Sie zeigten sich frühestens am 11. Tag p.i. in Form eines geringgradigen papulösen Exanthems am Schwanz und einer Ödematisierung der Planten ab dem 16. Tag p.i. Diese Veränderungen heilten innerhalb einer Woche wieder ab und waren bis zum Versuchsende am 28. Tag p.i. völlig verschwunden.

4.1.2. Titration des Stammes "Düsseldorf E 2"

Für die Titrationen verwendeten wir die 154. und die 179. 3T6-Passage.

Krankheitserscheinungen traten bei den Virusverdünnungen 10^0 bis 10^{-8} auf. Störungen des Allgemeinbefindens beobachteten wir ab dem 3. Tag p.i.; die ersten Todesfälle setzten am 5. Tag p.i. ein. Bis zum 10. Tag p.i. waren alle Tiere der Verdünnungen 10^0 bis 10^{-2} gestorben. Der Sektionsbefund ergab die typischen Veränderungen einer akuten Ektromelie (siehe unter 4.1.1.).

Wir errechneten für beide Passagen LD_{50} -Werte von $10^{5,8}$ bzw. $10^{4,6}$ LD_{50}/ml .

Chronische Ektromelie-Symptome begannen ab dem 10. Tag p.i. und hielten z.T. bis zum Versuchsende am 28. Tag p.i. an. Sie bestanden zunächst in papulösen, später ulzerativen Schwanzläsionen und in einem deutlichen Plantenödem. Auch Konjunktivitis, Blepharitis und ein sog. Mumpsgesicht waren zu beobachten. In der 3. und 4. Woche p.i. kam es bei einigen Tieren, die mit den Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-6} infiziert waren, zu schwerer Gangrāneszierung und Demarkation von Schwanz und Planten. Diese Läsionen blieben bis zum Versuchsende bestehen. Bei den Verdünnungen 10^{-7} und 10^{-8} waren die Hautveränderungen am 28. Tag p.i. abgeheilt.

4.2. Titrationen der Ektromelie-Virus-Stämme in infantilen Mäusen

4.2.1. Titration des Stammes "Hampstead"

Wir titrierten die 130., die 156. und die 224. 3T6-Passage sowie die 0. FHE-Passage von Virusmaterial,

das zuvor 138 mal in 3T6-Zellen passagiert worden war. Als unspezifisch werteten wir Todesfälle, die bis zum 2. Tag p.i. auftraten. Dann zeigten sich bei den mit den höchsten Viruskonzentrationen (10^0 bis 10^{-2}) infizierten Tieren Allgemeinsymptome in Form von Kümern, Saugunlust und allgemeiner Schwäche. Sie starben ab dem 3. Tag p.i. in rascher Folge an der perakuten Verlaufsform der Mäusepocken. Bis zum Ende der 1. Woche p.i. waren in der Regel alle Babymäuse der Verdünnungen 10^0 bis 10^{-4} bzw. 10^{-5} verendet. Bei den höheren Verdünnungen traten auch in der 2. Woche p.i. noch Todesfälle auf.

Immer fanden wir als pathologisch-anatomische Veränderungen eine Milzhyperplasie, Leberschwellung und -verfettung, gelegentlich auch eine Pleuritis, Lungenkongestion und Ischämie der Nieren.

Chronische Verlaufsformen wurden nicht beobachtet. Am 21. Tag p.i. errechneten wir die jeweiligen LD_{50} -Werte (siehe Tabelle I, S. 40).

4.2.2. Titration des Stammes "Düsseldorf E 2"

Wir titrierten die 179., die 202. und die 248. 3T6-Passagen sowie die 0. FHE-Passagen nach 162 Passagen in 3T6-Zellen.

Todesfälle bis zum 2. Tag p.i. galten als unspezifisch. Doch zeigten am 2. Tag p.i. bereits die Würfe, die mit den höchsten Konzentrationen infiziert waren, Apathie, verminderte Sauglust und Entwicklungsstörungen. Die ersten spezifischen Todesfälle registrierten wir am 3. Tag p.i.; am 7. Tag p.i. waren fast stets alle Babymäuse der Verdünnungen 10^0 bis 10^{-5} bzw. 10^{-6} an perakuter bzw. akuter Ektromelie gestorben. Auch in der 2. Woche p.i.

erlagen noch Tiere der Infektion. In der 3. Woche p.i. zeigten sich bei Mäusen, die mit den Verdünnungen 10^{-6} bis 10^{-8} infiziert worden waren, vereinzelt Veränderungen, die auf einen chronischen Verlauf schließen lassen: Plantenschwellung, Schwanzläsionen, Mumpsgesicht.

Oft erkrankten dann auch die Mütter der infizierten Säuglingsmäuse an chronischer I.E.

Die Sektion der verendeten Babymäuse ergab die gleichen pathologischen Veränderungen wie unter 4.2.1. beschrieben. Zu Versuchsende (am 21. Tag p.i.) berechneten wir die LD_{50} -Werte (vgl. Tabelle I, S. 40).

4.3. Ergebnisse der Vorversuche

4.3.1. Ergebnis des 1. Vorversuchs

In der Gruppe der 4 Tage alten Babymäuse überlebten weder die Kontrollen noch die Säuglingsmäuse von immunisierten Müttern (mit einer Ausnahme). Bis zum 7. Tag p.i. waren fast alle Säuglingsmäuse gestorben, nur 3 Tiere lebten bis zum 11. Tag p.i. Praktisch das gleiche Ergebnis zeigten die 12 Tage alten Versuchstiere. Hier starben sowohl die Kontrollen als auch die Jungen immunisierter Mütter bis zum 8. Tag p.i. an der Belastungsinfektion. Lediglich 2 Tiere lebten bis zum 12. Tag p.i.

Auch in der Gruppe der 20 Tage alten Tiere gab es keine Überlebenden nach Belastung mit $10^{3,8} LD_{50}$. Bei den mit $10^{1,8} LD_{50}$ belasteten Babymäusen fanden wir keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen.

Die beim Belastungszeitpunkt 6 Wochen alten Versuchstiere ließen jedoch eine deutliche Unempfindlichkeit gegenüber beiden Belastungsdosen im Vergleich zu den Kontrollen erkennen, wobei allerdings kein gravierender Unter-

schied in der Immunogenität der zur Immunisierung der Muttertiere verwendeten Impfstoffstämme festzustellen war.

Einzelheiten sind Tabelle V zu entnehmen.

Da sich bezüglich des gewählten Immunisierungszeitpunktes (7 Tage vor bzw. nach Decktermin bzw. gleichzeitig) keine signifikanten Differenzen ergeben hatten, wurde auf eine entsprechende Aufschlüsselung in der Tabelle verzichtet. Wir hatten jedoch den Eindruck, als ob vor Beginn der Trächtigkeit immunisierte Mäusemütter eine etwas stärkere passive Immunität verliehen.

Insgesamt zogen wir aus dem Vorversuch den Schluß, daß die Wirkung einer wesentlich stärkeren Immunisierung in einem zweiten Vorversuch getestet werden sollte, wobei wir eine im Vergleich zum ersten Vorversuch mittlere Belastungsdosis verwenden wollten.

Tabelle V: Ergebnis des 1. Vorversuchs: Prozentsatz überlebender Säuglingsmäuse von immunisierten und nicht immunisierten Müttern nach Belastungsinfektion mit virulentem Ektromelie-Virus

Belastungs- alter	Impfvirusstämme				Kontrollen	
	MVA		E (Hamp.)			
	Belastungsdosis in log 10 LD ₅₀					
	3,8	1,8	3,8	1,8	3,8	1,8
Überlebende Säuglingsmäuse in %						
4 Tage	0	0	0	7	0	0
12 Tage	0	0	0	0	0	0
20 Tage	0	13	0	32	0	28
6 Wochen	28	55	38	70	0	19

4.3.2. Ergebnis des 2. Vorversuchs

Die Immunisierung wurde von den Mäuseweibchen gut vertragen. Sie zeigten sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Impfung keinerlei Störungen des Allgemeinbefindens. Die Fertilität und das Wurfergebnis wurden ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug ca. 12 Säuglingsmäuse. Die Geburten erfolgten in der Regel 21 - 28 Tage nach dem Zusetzen der männlichen Tiere. Der Decktermin war folglich ziemlich genau festlegbar.

Die Challenge-Infektion der Säuglingsmäuse dreier verschiedener Altersstufen, die von den mit E (Hamp.) immunisierten Muttertieren abstammten, ergab eine deutliche, mit zunehmendem Alter sinkende Immunität. Die im Alter von 4 Tagen infizierten Babymäuse überlebten zu 90 % die Infektion mit virulentem EV. Auch die zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion 11 Tage bzw. 18 Tage alten Säuglingsmäuse ließen noch einen wirksamen Immunschutz erkennen. Hier überlebten 45 % bzw. 17 % der infizierten Tiere.

Im Gegensatz dazu bewirkte der VV-Stamm MVA anscheinend keine wirksame passive Immunität. Hier erlagen alle Säuglingsmäuse, unabhängig von ihrem Alter, der Infektion mit virulentem EV. Der Verlauf der Challenge-Infektion war bei den mit MVA immunisierten Tieren ebenso fulminant wie bei den Kontrollen. Am 7. Tag p.i. waren in der Regel alle diese Babymäuse gestorben. Der Versuch zeigte uns, daß durch die Erhöhung der Immunisierungsdosis und durch zweifache Impfstoffapplikation mit dem Stamm E (Hamp.) anscheinend aufgrund besserer immunogener Eigenschaften ein belastbarer maternaler Immunschutz der Säuglingsmäuse erzielt werden kann,

während dies mit dem Stamm MVA offensichtlich nicht auf diese Weise gelingt.

Eine Übersicht der Versuchsergebnisse vermittelt Tabelle VI.

Tabelle VI: Ergebnis des 2. Vorversuchs: Prozentsatz überlebender Säuglingsmäuse von immunisierten und nicht immunisierten Müttern nach Belastungsinfektion mit virulentem EV

Belastungs- alter	Impfvirusstämme		Kontrollen
	MVA	E (Hamp.)	
	Belastungsdosis: $10^{2,7}$ LD ₅₀		
	Überlebende Säuglingsmäuse in %		
4 Tage	0	90	0
11 Tage	0	45	0
18 Tage	0	17	0

4.4. Ergebnis des Hauptversuchs

Im Hauptversuch wollten wir durch dreimalige Applikation hoher Dosen des Stammes MVA dessen offensichtlich schwache antigene Wirksamkeit verbessern, um so eine passiv übertragene Immunität doch noch nachzuweisen. Außerdem bezogen wir den schon früher vom Institut als Mäusepocken-Impfstoff verwendeten VV-Stamm CVB mit in den Vergleich ein.

Die Immunisierung wurde von den Mäuseweibchen bei allen drei Impfstämmen reaktionslos vertragen.

Die Belastungsinfektionen der Säuglingsmäuse lassen folgende Zusammenhänge erkennen:

- a) Bei einer Dosierung von $10^{2,7}$ LD₅₀ wurde eine evtl. vorhandene passive Immunität bei fast allen Gruppen durchbrochen. Die Babymäuse starben an typischer Ektromelie im gleichen Zeitraum wie die Kontrolltiere.
- b) Die mit $10^{0,7}$ LD₅₀ durchgeführte Belastungsinfektion läßt dagegen in allen Gruppen eine passiv übertragene Immunität erkennen, auch wenn man berücksichtigt, daß die Kontrollen nicht alle an dieser Dosis starben.

Die Todesfälle traten jedoch später als bei a) auf, und sie erstreckten sich auch über einen längeren Zeitraum. Einige Tiere erholten sich wieder nach einer kurzen Krankheitsphase.

Der Infektionsschutz scheint allerdings mit zunehmendem Lebensalter generell zu sinken. Im Vergleich der Impfstoffstämme untereinander tritt kein wesentlicher Unterschied zutage, läßt man außer Betracht, daß die Muttertiere mit sehr unterschiedlichen Immunisierungsdosen behandelt worden waren (vgl. unten).

- c) Bei den Gruppen, die wir mit $10^{1,7}$ LD₅₀ belasteten, konnten zwar weniger hohe Überlebensraten festgestellt werden als bei den mit $10^{0,7}$ LD₅₀ belasteten Tieren, doch zeigte sich jetzt eine deutlich bessere Immunisierung durch den Stamm E (Hamp.) als durch die beiden VV-Stämme.

Allerdings fällt auf, daß diesmal der Prozentsatz der geschützten Tiere mit zunehmendem Alter ansteigt. Der Infektionsverlauf nach Applikation von $10^{1,7}$ LD₅₀ bei erkrankten und gestorbenen Kontrolltieren war akut, wenn auch gegenüber der Gruppe a) verzögert.

Die Ergebnisse des Hauptversuchs sind in Tabelle VII zusammengefaßt (siehe S. 57).

Tabelle VII: Ergebnis des Hauptversuchs: Prozentsatz überlebender Säuglingsmäuse von immunisierten und nicht immunisierten Müttern nach Belastungsinfektion mit virulentem Ektromelie-Virus

Belastungs- alter	I m p f v i r u s s t ä m m e										Kontrollen		
	MVA			CVB			E (Hamp.)						
	B e l a s t u n g s d o s i s i n l o g 10 LD ₅₀												
	0,7	1,7	2,7	0,7	1,7	2,7	0,7	1,7	2,7	0,7	1,7	2,7	
	Ü b e r l e b e n d e S ä u g l i n g s m ä u s e i n %												
4 Tage	90	0	0	80	8	0	100	8	0	10	0	0	
8 Tage	80	15	0	95	20	10	80	35	15	20	10	0	
12 Tage	90	5	0	95	15	0	50	23	0	15	5	0	
16 Tage	40	10	0	90	13	0	60	78	45	10	5	0	
20 Tage	20	50	n.d.	45	25	n.d.	55	85	n.d.	20	10	n.d.	
n.d. = nicht durchgeführt													

4.5. Virusnachweis in Säuglingsmäusen

Die Untersuchung der Organe von moribunden Säuglingsmäusen, die mit virulentem EV belastet worden waren, am 3. Tag p.i. verlief positiv. Auf der mit Organverreibungen beimpften CAM 10 Tage alter Hühnerbruteier konnten wir am 5. Tag p.i. Ektromelie-Virus-spezifische Veränderungen nachweisen. Sie bestanden in den typischen weißen, stecknadelkopfgroßen Pockenherdchen, die besonders in der Umgebung der großen Gefäße lokalisiert waren.

In den Organen von 1 und 12 Tage alten Babymäusen, die von mit E (Hamp.) immunisierten Muttertieren abstammten, konnten wir dagegen mit der gleichen Methode vor der Belastungsinfektion kein EV feststellen. Dieser negative Befund unterstützt die Annahme, daß eine intrauterine Infektion der Föten mit dem Impfvirus nicht stattgefunden hatte.

4.6. Hämagglutinations-Hemmungs-Reaktion (HAH-Reaktion)

Die Überprüfung der Sammelseren, die wir von den mit E (Hamp.), CVB und MVA immunisierten weiblichen Mäusen 21 Tage nach der letzten Impfung (i.d.R. kurz vor dem Wurftermin) gewonnen hatten, erbrachte folgende Resultate: Hemmungstiter von durchschnittlich 1:8 ließen sich nur in den Seren der mit E (Hamp.) und CVB vakzierten Tiere feststellen. Bei den mit MVA geimpften Mäusen waren keine HAH-Antikörper im Serum nachweisbar. Bei der Untersuchung der Sammelseren des 21. Tages p.i. von Säuglingsmäusen, die die Challenge-Infektion überlebt hatten, fanden wir Hemmungstiter von 1:4 bis 1:16.

Es traten keine Titerunterschiede zwischen den einzelnen Immunisierungsgruppen auf.

Das vor Versuchsbeginn gewonnene Sammelserum und die Seren der Kontrolltiere enthielten keine orthopoxvirus-spezifischen HAH-Antikörper.

5. Besprechung der Ergebnisse

Die Verimpfung von aktivem VV zur Immunisierung von Labormäusen gegen I.E. ist problematisch (vgl. 2.10.3.), auch wenn es zu keiner äußerlich erkennbaren Impfkrankheit bei der Maus kommt.

Die Verwendbarkeit eines hochattenuierten und immunisierenden MPV-Stammes, der nicht humanpathogen ist, böte die Möglichkeit, die vom VV ausgehende Infektionsgefahr für den Menschen auszuschließen. Der als attenuiert bezeichnete, in Zellkulturen gezüchtete EV-Stamm "Hampstead" ist jedoch für die übliche i.p.-Immunisierung von Mäusen anscheinend nicht einsetzbar, da er eine noch zu große Restvirulenz besitzt (MUNZ et al., 1976).

In vorliegender Arbeit wurde getestet, ob höhere Zellkulturpassagen dieses Stammes zu einem weiteren Virulenzverlust geführt haben. Wir titrierten vergleichend die 130., die 156. und die 224. 3T6-Passage sowie die 0. FHE-Passage nach 138 3T6-Passagen in Säuglingsmäusen und teilweise auch in erwachsenen Tieren.

In Saugmäusen zeigten alle getesteten Passagen praktisch noch keine Attenuierung. Der LD_{50} -Wert der 224. 3T6-Passage war zwar gegenüber dem der 130. 3T6-Passage um eine Zehnerpotenz niedriger, doch ist noch nicht geklärt, ob dieser Titerverlust durch eine Attenuierung bewirkt wurde. Auch Jungtiere bis zum Absetzalter vertragen diesen Stamm nicht reaktionslos, da es noch zum Auftreten klinischer Symptome und sogar zu Todesfällen kommen kann. Die erhaltenen LD_{50} -Werte für diese ca. 4 Wochen alten Mäuse lassen demnach gegenüber nicht attenuiertem EV eine zwar wesentlich reduzierte, doch immer noch deutliche Restvirulenz erkennen.

Eine generelle Verwendbarkeit des Stammes "Hampstead" zur aktiven Immunisierung von Jungtieren ist deshalb selbst nach 224 Zellkulturpassagen noch nicht angezeigt, auch wenn die zweimalige Immunisierung erwachsener (ab 6. Lebenswoche) und tragender Mäuse mit $10^{2,0}$ und $10^{4,0}$ KID₅₀ reaktionslos vertragen wurde.

Ob eine vollständige Attenuierung im Laufe weiterer Passagen erzielt werden kann, läßt sich nicht vorher-sagen. Dies muß wie bei anderen attenuierten Pocken-viren - so z.B. beim VV-Stamm MVA (MAYR et al., 1975), beim Hühnerpockenvirus-Stamm HP-1 (MAYR et al., 1971) und beim Kanarienvirus-Stamm KP-1 att. (MAYR et al., 1965) - durch entsprechende Infektionsversuche ge-klärt werden.

Das Schergewicht unserer Untersuchungen galt folgenden Fragen:

- a) Ist es möglich, mit einem MPV-Stamm gegen MP ge-fahrlos zu immunisieren?
- b) Auf welche Weise wäre eine solche Immunisierung mit einem derzeit zur Verfügung stehenden MPV-Stamm durchführbar und wirtschaftlich vertretbar?
- c) Finden sich bei positivem Ausfall der Versuche An-haltspunkte dafür, Impfstoffe, die auf der Basis von VV als immunogenem Prinzip aufgebaut sind, durch solche zu ersetzen, die das für den Menschen apatho-gene MPV enthalten?

In diesem Zusammenhang prüften wir, ob man weibliche weiße Mäuse vor bzw. während der Trächtigkeit mit der 0. FHE/138. 3T6-Passage des EV-Stammes "Hampstead" so immunisieren kann, daß ihre Nachkommen in den ersten Lebenswochen eine durch virulentes Virus belastbare passive Immunität erhalten. Eine solche könnte dann ja auch durch eine aktive Immunisierung mit abgeschwächtem

(teilattenuiertem) MPV entsprechend gefahrlos verbessert werden.

Ein Beispiel für einen derartigen Impfmodus geben BACHMANN und HESS (1978). Danach kann durch eine zweimalige orale Immunisierung trächtiger Sauen mit einem abgeschwächten (teilattenuierten) Transmissible-Gastroenteritis-Virusstamm eine auf Ferkel übertragene belastbare passive Immunität bewirkt werden.

Über die Infektion von infantilen Mäusen mit EV und die passiven Immunitätsverhältnisse bei diesen Tieren arbeitete besonders FENNER (1948 a u. 1949 d). Seine Untersuchungen lassen sich bezüglich der verwendeten Infektionsdosen und dem Modus der Belastungsinfektion zwar nicht mit unserer Technik vergleichen, doch berichtet er über eine hauptsächlich laktogen übertragene passive Immunität bei 14 Tage alten Säuglingsmäusen, die einer intraplantaren Infektion mit 10^3 EID₅₀ standhielt. Solche laktogen übertragenen Antikörper waren bis zum Ende der 6. Lebenswoche nachweisbar. FENNER (1948 a) schreibt, daß derart geschützte infantile Mäuse in enzootisch verseuchten Zuchten aufwachsen können, ohne an der Infektion mit virulentem MPV zu sterben. Der Autor untersuchte jedoch nicht, inwieweit man diese passive Immunität für Immunisierungsmaßnahmen ausnutzen kann.

Die überragende Bedeutung der in der Milch enthaltenen Antikörper bei der passiven Immunität konnten auch MAHNEL und MUNZ (1965) sowie HERRLICH et al. (1968) bei Säuglingsmäusen, die von mit Variola- bzw. Vaccinia-Virus immunisierten Muttertieren abstammten, durch Belastungsinfektion mit virulentem Variola-Virus nachweisen.

Wir können die obigen Befunde bezüglich der Wirkung maternalen Antikörper bestätigen und hinsichtlich unserer Fragestellung in positivem Sinne ergänzen. Es war möglich, erwachsene weibliche Mäuse so zu immunisieren, daß deren Nachkommenschaft einen meßbaren Infektionsschutz erhielt. Dabei zeigte sich, daß dieser passiv erhaltene Schutz offensichtlich besser durch homologes Virus, also durch MPV, erzielt wird als durch die beiden vergleichsweise getesteten VV-Stämme MVA und CVB.

Auch FENNER (1949 a) hat schon festgestellt, daß das Überstehen einer MPV-Infektion eine wesentlich stärkere und länger anhaltende Immunität verleiht als die Impfung mit aktivem VV. Bei unseren Versuchen zeigten selbst 100fach höhere Virusdosen der beiden VV-Stämme keine besseren Ergebnisse als der EV-Stamm "Hampstead". Somit konnten die Befunde von MUNZ et al. (1976) bei Versuchen zur Aerosol-Impfung gegen MP bestätigt werden. Allerdings konnten wir zwischen den beiden VV-Stämmen bei unseren Versuchsbedingungen keine deutlich erkennbaren Differenzen in ihrer immunogenen Wirksamkeit herausfinden.

Wir prüften den Schutz der infantilen Mäuse durch eine intrepritoneale Belastungsinfektion mit einem hochvirulenten EV-Stamm. Dieser Infektionsmodus gewährt die größtmögliche Sicherheit hinsichtlich Einbringung gleich großer Virusmengen als auch für das "Angehen" einer Infektion. Insofern glauben wir, daß der bei unseren Versuchstieren nachgewiesene Infektionsschutz spezifisch ist und nicht auf anderen Abwehrmechanismen beruht.

Bei der Beurteilung eines Infektionsschutzes von Säuglingsmäusen muß neben der Wirkung einer passiven Immunität auch die Möglichkeit einer latenten Virusinfektion

mit Erregerpersistenz in Betracht gezogen werden. GERMER et al. (1961) beschreiben eine latente EV-Infektion in Kulturen embryonaler Mäusezellen, die aus den Föten infizierter Mütter gewonnen wurden. Die Autoren führen die Infektion auf eine diaplazentare Übertragung des Erregers zurück.

Nach SCHWANZER et al. (1975) ist die intrauterine Infektion mit EV zu jedem Zeitpunkt der Gravidität möglich. Sie konnten den Erreger bereits am 3. Tag p.i. aus Uteri und Föten einzelner Tiere und am 9. Tag p.i. aus sämtlichen untersuchten Föten isolieren.

Beim für Säuglingsmäuse avirulenten VV-Stamm MVA (MAYR et al., 1975) ist nicht mit einer intrauterinen Infektion zu rechnen. Über den VV-Stamm CVB und den EV-Stamm "Hampstead" liegen keine diesbezüglichen Angaben vor. Wir prüften deshalb die Organe von 1 und 12 Tage alten Säuglingsmäusen, die von mit EV immunisierten Müttern abstammten, auf ihren Virusgehalt, konnten allerdings kein EV nachweisen. Es könnte sich hier ein Parameter zur Bestimmung eines Virulenzverlustes aufzeigen, der besonders für passive Immunisierungsfragen von Bedeutung wäre.

FENNER (1948 a) konnte bei Tieren, die eine Infektion mit virulentem EV überstanden hatten und wieder gesund waren, kein Virusträgertum feststellen. Deshalb ist beim virulenzgeschwächten EV-Stamm "Hampstead" weder mit einer Viruspersistenz noch mit einer Kontagiosität der geimpften erwachsenen Tiere, die epidemiologisch bedenklich wäre, zu rechnen.

Darüber hinaus muß berücksichtigt werden, daß infantile Tiere mit zunehmendem Alter selbst immer mehr zu einer spezifischen Immunantwort fähig werden, d.h. daß sie

eine Immunkompetenz erwerben. Man diskutiert, daß diese bereits vor der Geburt in beschränktem Umfang einsetzen kann (BUSCHMANN, 1970). Es ist denkbar, daß durch eine steigende Immunkompetenz während der kritischen postnatalen Phase der Verlust der passiven Immunität zu einem gewissen Grad ausgeglichen wird.

Bei der Beurteilung unserer Versuchsergebnisse muß eingeräumt werden, daß die Prozentsätze der Überlebenden bei den einzelnen Versuchstiergruppen sich nicht immer erwartungsgemäß verhalten. Auch mag die Zahl der Versuchstiere an sich kritisiert werden. Hierzu geben wir zu bedenken, daß es vor allem arbeitstechnisch nicht durchführbar war, noch größere Versuchstierzahlen zu verwenden.

Als mögliche Ursachen schwankender Immunisierungserfolge ist an individuelle Unterschiede bei der Immunantwort einzelner Mäusemütter zu denken. Eine schwache Antikörperantwort bei einem einzigen Muttertier wirkt sich bei unseren Versuchen auf mindestens 10 Babymäuse nachteilig aus.

Nach FENNER (1948 a) soll der Antikörpertiter der Muttermilch dem des Serums entsprechen, und Säuglingsmäuse erhalten durch die Kolostrumaufnahme Antikörpertiter, die die Hälfte des mütterlichen Serumtiters betragen. Um darüber eine orientierende Aussage machen zu können, untersuchten wir Sammelseren von Muttertieren am 21. Tag nach der letzten Immunisierung, also kurz vor dem zu erwartenden Geburtstermin, im HAH-Test. Es zeigte sich, daß die mit den Impfvirusstämmen "Hampstead" und CVB immunisierten Tiere durchschnittliche Titer von 1:8 aufwiesen, während sich bei den mit MVA immunisierten Mäusen keine HAH-Antikörper nachweisen ließen.

Das serologische Ergebnis demonstriert eine offensichtlich unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit der drei verwendeten Impfstoffstämme in der Maus. Der EV-Stamm "Hampstead" induzierte sogar bei 100fach niedrigerer Dosierung dieselben Antikörpertiter wie der VV-Stamm CVB. Das Fehlen von HAH-Antikörpern bei den mit MVA geimpften Tieren entspricht den Befunden von MAYR und MUNZ (1964), nach denen der VV-Stamm MVA keine HAH-Antikörper mehr hervorruft. Er vermehrt sich kaum noch in einem Säugetierorganismus.

Eine Untersuchung der Seren der Babymäuse vor der Belastungsinfektion war begreiflicherweise aus technischen Gründen nicht möglich; doch testeten wir Sammlereren von infantilen Tieren am 21. Tag nach der Belastung. Es waren Titer von 1:4 bis 1:16 nachweisbar, doch ergaben sich zwischen den einzelnen Immunisierungsgruppen keine Unterschiede.

Aus unseren Versuchsergebnissen ziehen wir den Schluß, daß unter dem Schutz einer passiven Immunität infantile Mäuse mit dem verwendeten Impfvirusstamm "Hampstead" sicher und in epidemiologischer Hinsicht gefahrlos vakziniert werden könnten. Es zeigt sich demnach die Möglichkeit auf, anstatt VV-haltiger Impfstoffe solche mit attenuiertem EV als wirksamem Prinzip zu verwenden. Das Verfahren hätte mehrere Vorteile, so vor allem, daß mit nicht humanpathogenen Erregern immunisiert wird. Darüber hinaus könnte durch die passive und aktive Immunisierung mit homologem Virus eine sehr gute Immunität erzielt werden, die zudem auf technisch einfachem und wirtschaftlich vertretbarem Wege erreichbar wäre.

6. Zusammenfassung

Im Literaturteil der Arbeit wird das Krankheitsbild der Mäusepocken abgehandelt und dabei besonders die Immunitätsverhältnisse und die Möglichkeiten der Immunprophylaxe besprochen.

Der experimentelle Teil befaßt sich mit Untersuchungen zur Belastbarkeit einer passiven Immunität von infantilen Mäusen, deren Muttertiere mit den Vaccinia-Virus-Stämmen MVA bzw. CVB oder mit dem als attenuiert geltenden Ektromelie-Virus-Stamm "Hampstead" vor bzw. während der Gravidität mehrfach immunisiert worden waren.

Nur die Impfstoffe CVB und "Hampstead" riefen die Bildung von hämagglutinationshemmenden Antikörpern hervor. Ein passiv übertragener Immunschutz gegenüber einer intraperitonealen Belastungsinfektion mit virulentem Ektromelie-Virus ließ sich bis zu drei Wochen post partum dann nachweisen, wenn die Muttertiere entweder zweimal mit $10^{2,0}$ und $10^{4,0}$ KID₅₀ des Stammes "Hampstead" oder mit mindestens 100fach höheren Dosen der Vaccinia-Virus-Stämme geimpft worden waren. Die Vakzinierung führte zu keiner intrauterinen Infektion der Föten. Die 224. Zellkulturpassage des Stammes "Hampstead" ist für Säuglingsmäuse noch virulent, doch erkrankten geschlechtsreife weibliche Tiere nach i.p.-Applikation von $10^{2,0}$ und $10^{4,0}$ KID₅₀ im Abstand von zwei Wochen nicht mehr an Mäusepocken.

Die Verwendbarkeit dieses Ektromelie-Virus-Stammes als Impfvirus anstelle von Vaccinia-Virus-haltigen Impfstoffen zur aktiven Immunisierung gegen Mäusepocken unter dem Schutz einer passiven Immunität wird diskutiert.

7. Summary

THE RESISTANCE OF A MATERNALLY-DERIVED IMMUNITY OF BABYMICE AGAINST MOUSEPOX - EXPERIMENTS REGARDING A SPECIAL POSSIBILITY OF IMMUNIZATION WITH ORTHOPOX VIRUSES

The first part of the thesis gives a review about mousepox with special emphasis on immunological aspects of the disease and its prevention by immunization methods. The experimental part of this work deals with examinations regarding the resistance of a passive immunity of babymice whose mothers had been immunized before or during pregnancy several times with either the vaccinia virus strains MVA, CVB or the so-called attenuated ectromelia virus strain "Hampstead" respectively. The vaccines CVB and "Hampstead" were found to cause the production of haemagglutination-inhibiting antibodies only. A passively-transmitted immunity of babymice was proven to be effective against an intraperitoneal challenge-infection with a virulent ectromelia virus strain for as long a period as 3 weeks after birth, if their mothers had been vaccinated with either of the following:

- $10^{2,0}$ and $10^{4,0}$ KID₅₀ of the "Hampstead" strain, or
- one of the vaccinia virus strains in a dosage 100-times as large.

The vaccination did not lead to an intrauterine infection of the fetuses. After 224 tissue culture passages, the "Hampstead" strain was found to be still virulent for babymice; however, female adult mice which had been intraperitoneally inoculated with $10^{2,0}$ and then $10^{4,0}$ KID₅₀ two weeks later demonstrated no signs of mousepox. The possibility for using this ectromelia virus strain instead of vaccinia virus for active immunization against mousepox of young animals under the protection of a passive immunity is discussed.

8. Literaturverzeichnis

- BACHMANN P.A. und R.G. HESS (1978): Orale Vakzinierung gegen die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine. Fortschr. Vet.Med. 28, 187-191
- BARSKI G. und F. CORNEFERT (1960): Mise en évidence, en cultures de la souche cellulaire HeLa, de l'infection ectromélique latente chez la souris. Ann.Inst. Pasteur 98, 112-118
- BAUER D.J. und P.W. SADLER (1961): Derivates of Isatin- β -Thiosemicarbazone with antiviral chemotherapeutic activity against ectromelia infection. Nature 190, 1167-1169
- BAXBY D. (1975): Identification and Interrelationships of the Variola/Vaccinia-Subgroup of Poxviruses. Progr. Med.Virol. 19, 215-246
- BAXBY D. (1977): Possible Antigenic Sub-Divisions within the Variola/Vaccinia-Subgroup of Poxviruses. Arch. Virol. 54, 143-145
- BLANDEN, R.V. (1974): T-Cell Response to Viral and Bacterial Infection. Transplant. Rev. 19, 56-88
- BONIN O. (1973): Quantitativ-virologische Methodik. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- BRIODY B.A. (1959): Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses. Bact.Rev. 23, 61-94
- BRAMBELL F.W.R. (1958) The passive immunity of the young mammal. Biol.Rev. 33, 488
- BURNET F.M. und W.C. BOAKE (1946): The relationship between the virus of Infectious Ectromelia of mice and vaccinia virus. J.Immunol. 53, 1-15
- BUSCHMANN H. (1970): Reifung und Alterung der immunologischen Kompetenz. Tierärztl. Umschau 11, 525-535
- CARTHEW P., A.C. HILL und A.P. VERSTRAETE (1977): Some observations on the diagnosis of an outbreak of ectromelia in 1976. Vet.Rec. 100, 293

- CHRISTENSEN L.R., ST. WEISBROTH und B. MATANIC (1966): Detection of ectromelia virus and ectromelia antibodies by Immuno-fluorescence. *Lab. Animal Care* 16, 129-141
- COHRS P., R. JAFFE und H. MEESSEN (1958): Pathologie d. Laboratoriumstiere. Band II: Infektionskrankheiten. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg
- DIEFENTHAL W. und K.-O. HABERMEHL (1959): Verhalten und Nachweis von Ektromelievirus in der Gewebekultur. *Zbl. Bakt. I.* Orig. 175, 67-80
- DIEFENTHAL W. und K.-O. HABERMEHL (1961): Quantitative Untersuchungen über Adsorption und Eklipsephase bei Ektromelievirus (Mäusepocken). *Arch. Ges. Virusforsch.* 11, 440-452
- DULBECCO R. (1952): Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 362
- FENNER F. (1947 a): Studies in infectious ectromelia of mice: I. Immunization of mice against ectromelia with living vaccinia virus. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.* 25, 257-274
- FENNER F. (1947 b): Studies in infectious ectromelia of mice: II. Natural Transmission: The portal of entry of the virus. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.* 25, 275-282
- FENNER F. (1947 c): Studies in infectious ectromelia of mice. III. Natural Transmission: Elimination of the virus. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.* 25, 327-335
- FENNER F. (1948 a): The epizootic behaviour of mouse pox (infectious ectromelia of mice). *Brit. J. exp. Path.* 29, 69-91
- FENNER F. (1948 b): The clinical features and pathogenesis of mouse pox (infectious ectromelia of mice). *J. Path. Bact.* 60, 529-552
- FENNER F. (1949 a): Studies in mouse pox (infectious ectromelia of mice): IV. Quantitative investigations on the spread of virus through the host in actively and passively immunized animals. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.* 27, 1-18

- FENNER F. (1949 b): V. Closed epidemics in herds of normal and vaccinated mice. Austr. J.exp.Biol.Med.Sci. 27, 19-30
- FENNER F. (1949 c): VI. A comparison of the virulence and infectivity of three strains of ectromelia virus. Austr.J.exp. Bio.Med.Sci. 27, 31-43
- FENNER F. (1949 d): VII. The effect of the age of the host upon the response to infection. Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 27, 45-53
- FENNER F. (1976): Classification and nomenclature of viruses (Second report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Verlag S. Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney
- GERMER W.-D., W. DIEFENTHAL und K.-O. HABERMEHL (1961): Latente Infektion von Mäuseembryonen mit Ektromelievirus (Mäusepocken) infolge diaplazentarer Übertragung. Z.f.Hyg. 147, 269-276
- GLEDHILL A.W. (1962): Latent Ectromelia. Nature 196, 298
- GRUBER F. (1975): Immunologie der Versuchstiere. Schriftenreihe Versuchstierkunde Heft 3. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- GÜTTNER J. (1974): Morphologie der postakuten viszeralen Ektromelie. Z.Versuchstierk. 16, 113-123
- HABERMEHL K.-O. und W. DIEFENTHAL (1962): Kinematographische Untersuchungen an Fibroblasten nach Infektion mit Ektromelievirus (Mäusepocken). Arch.Ges. Virusforsch. 11, 629-643
- HERRLICH A. (1967): Die Pocken. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- HERRLICH A., CH. EPP und A. MAYR (1968): Tierexperimentelle Prüfung verschiedener Pockenimpfstoffe im Variola-Belastungsversuch an der weißen Maus. Z.Immunforsch. 135, 237-245
- HERRLICH A. und A. MAYR (1955): Die Differenzierung der Tierpockenviren im bebrüteten Hühnerei. Arch.Hyg. 139, 444-466
- HIRSCH M.S., A.J. NAHMIAS, F.A. MURPHY und J.H. KRAMER (1968): Cellular immunity in Vaccinia Infection of Mice. - Anti-Thymocyte Serum Effects on Primary and Secondary Responsiveness. J.exp.Med. 128, 121-132

- HOCHSTEIN-MINTZEL V. (1969): Passive und adoptive Immunisierung der Säuglingsmaus gegen Poxvirus vaccinia^e und variolae: Ein Beitrag zur Wertigkeitsprüfung von Pockenimpfstoffen. Z.Immunforsch. 138, 71-79
- HOCHSTEIN-MINTZEL V., CH. EPP und A. HERRLICH (1968 a): Erhöhte Belastbarkeit der Säuglingsmaus gegen die Infektion mit Variolavirus nach aktiver Immunisierung mit Vaccinia. Z.med.Mikrobiol.Immunol. 154, 160-169
- HOCHSTEIN-MINTZEL V., CH. EPP und A. HERRLICH (1968 b): Erhöhte Resistenz der Säuglingsmaus gegen Vaccinia-Virus nach aktiver, homologer Immunisierung. Z.Immunforsch. 135, 246-254
- HOCHSTEIN-MINTZEL V., H.-CH. HUBER und H. STICKL (1972): Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA). Z.Immunforsch. 144, 140-156
- HORZINEK M. (1965 a): Titration der hämagglutinationshemmenden Antikörper gegen das Ektromelievirus mittels der Mikromethode nach TAKATSY. Zbl.Bakt.I. Orig. 197, 18-25
- HORZINEK M. (1965 b): Eine einfache Labormethode zur Diagnose der Mäusepocken (Ektromelie). Z.Versuchstierk. 6, 134-140
- HORZINEK M. (1965 c): Untersuchungen zur Diagnose der Mäusepocken (Ektromelie) mittels der Agargel-Präzipitation. Arch. Ges.Virusforsch. 17, 264-272
- HORZINEK M. und W. HÖPKEN (1965 a): Untersuchungen über die inapparente Infektion mit dem Ektromelievirus. Arch.Ges.Virusforsch. 17, 125-138
- HORZINEK M. und W. HÖPKEN (1965 b): Serologische Untersuchungen über die experimentelle Ektromelie der Maus. Zbl.Bakt.I. Orig. 197, 26-33
- ICHIHASHI Y. und S. MATSUMOTO (1966): Studies on the Nature of Marchal Bodies (A-Type-Inclusion) during Ectromelia-Virus Infection. Virology 29, 264-275

- ICHIHASHI Y. und S. MATSUMOTO (1968): The Relationship between Poxvirus and A-Type-Inclusion Body during Double Infection. *Virology* 36, 262-270
- JUHR N.-C. und H.-H. HILLER (1973): Infektionen und Infektionskrankheiten bei Laboratoriumstieren. Schriftenreihe Versuchstierkunde Heft 2. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- KÄRBER G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn Schmiedbergs Arch.exp. Path. Pharmac. 162, 480
- KARASEK E. (1969): Möglichkeiten und Grenzen des fluoreszenz-serologischen Nachweises von Ektromelievirus in Organmaterial. *Z.Versuchstierk.* 11, 222-228
- KARASEK E. und W. ROHDE (1969): Zur Charakterisierung des Ektromelievirus in Zellkulturen. *Arch.Exp.Vet.Med.* 23, 49-57
- MAHNEL H. und E. MUNZ (1965): Diaplazentare und trophogene Übertragung der Variolaimmunität bei der weißen Maus. *Z.Hyg.* 150, 340-346
- MARCHAL J. (1930): Infectious Ectromelia, a hitherto undescribed virus disease of mice. *J.Path.Bact.* 33, 713-730
- MATSUMOTO S. (1958): Electron Microscopic Studies on the Proliferative Modus of Ectromelia Virus. *Acta Path.Japon.* 8, 735-753
- MAYR A. (1955): Zur Viruszüchtung im bebrüteten Hühnerei. *Rönt.Lab.Praxis* 8, 74
- MAYR A. (1956): Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren. *Arch.Ges. Virusforsch.* 6, 339
- MAYR A. (1976): TC-Marker des attenuierten Vaccinia-Impfstammes "MVA" in menschlichen Zellkulturen. *Zbl.Vet.Med. B* 23, 417-430
- MAYR A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN: Virologische Arbeitsmethoden. Band I (1974), Band II (1977). Gustav Fischer Verlag Stuttgart

- MAYR A., F. HARTIG und I. BAYR (1965): Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Kanarienspocken auf der Basis eines attenuierten Kanarienspocken-Kulturvirus. Zbl.Vet.Med.B. 12, 41
- MAYR A., V. HOCHSTEIN-MINTZEL und H. STICKL (1975): Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3, 6-14
- MAYR A., H. MAHNEL und E. MUNZ (1972): Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren. Zbl.Vet.Med.B. 19, 69-88
- MAYR A. und E. MUNZ (1964): Veränderungen von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig. 195, 24-35
- MAYR A., M. RATH und K. DANNER (1971): Perorale Immunisierung gegen Pocken. I.Mitteilung: Untersuchungen über eine Schluckimpfung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten H-Stamm HP-1. Zbl. Vet.Med.B. 18, 347
- MC CARTHY K. und A.W. DOWNIE (1948): An investigation of Immunological Relationships between the Viruses of Variola, Vaccinia, Cowpox and Ectromelia by Neutralization Tests on the Chorio-Allantois of Chick Embryos. Brit.J. exp.Path. 29, 501-510
- MIMS C.A. (1959 a): The response of mice to large intravenous injections of Ectromelia Virus, I. The fate of injected virus. Brit.J.exp.Path. 40, 533-542
- MIMS C.A. (1959 b): The response of mice to large intravenous injections of Ectromelia Virus. II. The growth of virus in the liver. Brit.J.exp.Path. 40, 543-550
- MOOSER H. (1943): Über die Infektion der weißen Maus mit einem Stamm klassischen Fleckfiebers und dem Virus der Infektiösen Ektromelie. Schweiz.Zschr.Path. Bakt. 6, 463-472
- MUNZ E., M. REIMANN, R. HOFFMANN und E. GÜBEL (1974): Perorale Immunisierungsversuche mit Vaccinia-Virus gegen Mäusepocken. Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B. 159, 10-30

- MUNZ E., M. REIMANN und W.-D. ZSCHEKEL (1976): Die Aerosol-Impfung gegen Mäusepocken (Infektiöse Ektromelie) im Vergleich zu anderen Vakzinationsverfahren unter Verwendung von Vaccinia- und Mäusepockenvirus-haltigen Impfstoffen. Zbl.Vet.Med.B. 23, 431-446
- OWEN D., A. HILL und S. Argent (1975): Reaction of mouse strains to skin test for ectromelia using an allied virus as inoculum. Nature 254, 598-599
- PETIT J.-CL. und G.-L. DAGUET (1977): Immunité cellulaire dans deux Infections expérimentales: Listériose et Ectromélie. Path.Biol. 25, 413-424
- RÖHRER H. (1967): Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Band II, Spezieller Teil 1. VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- ROHDE W. und E. KARASEK (1970): Zur Serodiagnostik der Ektromelie bei Versuchsmäusen. Arch.exp.Vet.Med. 24, 655-660
- SCHWANZER V., F. DEERBERG, J. FROST, B. LIESS, I. SCHWANZEROVA und W. PITTERMANN (1975): Zur intrauterinen Infektion der Maus mit Ektromelievirus. Z.Versuchstierk. 17, 110-120
- SOAVE O.A. und J.E. LUND (1970): Appearance and Distribution of Ectromelia Virus Inclusion Bodies in Experimentally infected Mice. Lab.Animal Care 20, 499-501
- SUBRAHMANYAN T.P. und C.A. MIMS (1967): A Study of the Production, Source and Action of Interferon appearing in Mice after the Intravenous Injection of Influenza Virus. Brit.J.exp.Path. 48, 568-577
- TRENTIN J.J. (1953): An Outbreak of Mouse-Pox (Infectious Ectromelia) in the United States: I. Presumptive Diagnosis. Science 117, 226-227
- TRENTIN J.J. und B.A. BRIODY (1953): An Outbreak of Mouse-Pox (Infectious Ectromelia) in the United States: II. Definitive Diagnosis. Science 117, 227-228

- TRENTIN J.J. und M.A. FERRIGNO (1957): Control of Mouse-Pox (Infectious Ectromelia) by Immunization with Vaccinia-Virus. J.Nat.Cancer Inst. 18, 757-767
- WOODROOFE G. und F. FENNER (1962): Serological Relationships within the Poxvirus Group: an Antigen common to all Members of the Group. Virology 16, 334-341
- ZELLER H. und G. RECKZEH (1965 a): Zur Immunisierung der weißen Maus gegen Ektromelie mit aktivem Vaccine-Virus. I. Mitteilung: Methoden und Grundlagen. Zbl.Bakt.I.Orig. 195, 282-295
- ZELLER H. und G. RECKZEH (1965 b): Zur Immunisierung der weißen Maus gegen Ektromelie mit aktivem Vaccine-Virus. II. Mitteilung: Praktische Erfahrungen. Zbl.Bakt.I.Orig. 197, 34-47
- BUNDESGESETZBLATT I, S. 1216, v. 18.5.1976

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch.

Sehr herzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. E. Munz für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung und seine freundliche Hilfsbereitschaft bei der Zusammenstellung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn M. Reimann, der mich mit Geduld in virologische Arbeitsmethoden einführte und mir jederzeit seinen Rat und seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche gewährte.

An dieser Stelle möchte ich auch meiner Mutter für ihre wertvolle Mithilfe bei der schriftlichen Endabfassung dieser Arbeit von ganzem Herzen danken.

9. Lebenslauf

Am 25.1.1952 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Alfred Kaufmann und seiner Ehefrau Irmgard geb. Kunz in Frankfurt am Main geboren.

Nach vierjährigem Grundschulbesuch in Hofheim am Taunus trat ich in das dortige Main-Taunus-Gymnasium ein, wo ich 1970 das Abitur bestand.

Zum Wintersemester 1970/71 nahm ich das Studium der Tiermedizin auf. Ich absolvierte die vorklinischen Semester an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, die klinischen an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Sommersemester 1976 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

Meine Approbation als Tierärztin erhielt ich am 5. August 1976.

Seit November 1976 arbeitete ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München als Doktorandin.

